

SÉRIE A, N° 1723

N° D'ORDRE :
2589

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

LUCIEN NEIPP

Pharmacien,
Licencié ès sciences,
Ancien Moniteur de Bactériologie à la Faculté de Pharmacie.

1^{re} THÈSE. — DE L'INFLUENCE DE DIVERS CATIONS SUR LE
CROIT MICROBIEN

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le devant la Commission d'examen.

30 JUIN 1937

MM. JAVILLIER, *Président.*

PLANTEFOL }
MONNIER } *Examineurs.*

PARIS
MASSON & C^{ie}, Éditeurs
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain

1937



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546311_0011

DE L'INFLUENCE DE DIVERS CATIONS
SUR LE CROÎT MICROBIEN

ÉTUDE DE L'ACTION A DOSES DIVERSES DU LANTHANE,
DU CÉRIUM, DU PLOMB, DU MERCURE, DE L'ARGENT,
SUR LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE

ROLE DES CHARGES ÉLECTRIQUES

SÉRIE A, N° 1723

N° D'ORDRE :
2589

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ÈS SCIENCES NATURELLES

PAR

LUCIEN NEIPP

Pharmacien,
Licencié ès sciences,
Ancien Moniteur de Bactériologie à la Faculté de Pharmacie.

1^{re} THÈSE. — DE L'INFLUENCE DE DIVERS CATIONS SUR LE
CROIT MICROBIEN

2^e THÈSE. — PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le

devant la Commission d'examen.

MM. JAVILLIER, *Président.*

PLANTEFOL }
MONNIER } *Examineurs.*

PARIS
MASSON & C^{ie}, Éditeurs
Libraires de l'Académie de Médecine
120, Boulevard Saint-Germain

—
1937

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

MM.

Doyen honoraire. . . . M. MOLLIARD.

Doyen C. MAURAIN, *Professeur*, Physique du Globe.

<i>Professeurs honoraires</i>	H. LEBESGUE.	FREUNDLER.	VESSIOT.
	A. FERNBACH.	AUGER.	PORTIER.
	Émile PICARD.	BLAISE.	MOLLIARD.
	Léon BRILLOUIN.	DANGEARD.	LAPIQUE.
	GUILLET.	LESPIAU.	
	PÉCHARD.	MARCHIS.	

PROFESSEURS

G. BERTRAND. . .	T	Chimie biologique.	ROBERT-LÉVY . .	T	Physiologie comparée.
M. CAULLERY. . .	T	Zoologie (Évolution des êtres organisés).	F. PICARD . . .		Zoologie (Évolution des êtres organisés).
G. URBAIN. . .	T	Chimie générale.	Henri VILLAT. .	T	Mécanique des fluides et applications.
Émile BOREL. . .	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique.	Ch. JACOB . . .	T	Géologie.
Jean PERRIN. . .	T	Chimie physique.	P. PASCAL . . .	T	Chimie minérale.
H. ABRAHAM. . .	T	Physique.	M. FRÉCHET . .	T	Calcul différentiel et Calcul intégral.
E. CARTAN. . .	T	Géométrie supérieure.	E. ESCLANGON .	T	Astronomie.
A. COTTON. . .	T	Recherches physiques.	M ^{me} RAMART -		
J. DRACH . . .	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.	LUCAS. . . .	T	Chimie organique.
Charles FABRY .	T	Enseignement de Physique.	H. BÉGHIN. . .	T	Mécanique physique et expérimentale.
Charles PÉREZ .	T	Zoologie.	Foch		Mécanique expérimentale des fluides.
Léon BERTRAND	T	Géologie structurale et géologie appliquée.	PAUTHENIER . .		Physique (P. C. B.).
E. RABAUD. . .	T	Biologie expérimentale.	DE BROGLIE . .	T	Théories physiques.
M. GUICHARD. .		Chimie minérale.	CHRÉTIEN . . .		Optique appliquée.
Paul MONTEL. .	T	Théorie des fonctions et Théorie des transformations.	P. JOB.		Chimie générale.
P. WINTREBERT.	T	Anatomie et histologie comparées.	LABROUSTE. . .		Physique du Globe.
L. BLARINGHEM.	T	Botanique.	PRENANT. . . .		Zoologie.
O. DUBOSCQ . .	T	Biologie maritime.	VILLEY		Mécanique physique et expérimentale.
G. JULIA. . . .	T	Mécanique analytique et Mécanique céleste.	BOHN		Zoologie (P. C. B.).
C. MAUGUIN . .	T	Minéralogie.	COMBES	T	Physiologie végétale.
A. MICHEL-LÉVY	T	Pétrographie.	GARNIER. . . .	T	Mathématiques générales.
H. BÉNARD. . .	T	Mécanique expérimentale des fluides.	PÉRÈS.		Mécanique des fluides.
A. DENJOY. . .	T	Application de l'analyse à la Géométrie.	HACKSPILL. . .		Chimie (P. C. B.).
L. LUTAUD. . .	T	Géographie physique et Géologie dynamique.	LAUGIER. . . .	T	Physiologie générale.
Eugène BLOCH .	T	Physique théorique et physique céleste.	TOUSSAINT. . .		Technique Aéronautique.
G. BRUHAT. . .		Physique.	M. CURIE. . . .		Physique (P. C. B.).
E. DARMOIS . .		Enseignement de Physique.	G. RIBAUD. . .	T	Hautes températures.
A. DEBIERNE. .	T	Physique générale et Radio-activité.	CHAZY.	T	Mécanique rationnelle.
A. DUFOUR. . .	T	Physique (P. C. B.).	GAULT.		Chimie (P. C. B.).
L. DUNOYER . .		Optique appliquée.	CROZE.		Recherches. Physiques.
A. GUILLIER-			DUPONT	T	Théories chimiques.
MOND	T	Botanique.	LANQUINE . . .		Géologie.
M. JAVILLIER. .		Chimie biologique.	VALIRON. . . .		Mathématiques générales.
L. JOLEAUD . .		Paléontologie.	BARRABÉ. . . .		Géologie structurale et géologie appliquée.
			MILLOT		Zoologie (P. C. B.).
			F. PERRIN . . .		Théories physiques.
			VAVON.		Chimie organique.
			G. DARMOIS . .		Calcul des Probabilités et Physique-Mathématiques.

Secrétaire A. PACAUD.

Secrétaire honoraire D. TOMBECK.



A ma mère,

A mon père.

A ma femme.

*En témoignage
de toute mon affection.*

A Monsieur le Professeur RADAIS

Doyen honoraire de la Faculté de Pharmacie de Paris,
Membre de l'Académie de Médecine.

En hommage

de ma très respectueuse gratitude.

A Monsieur le Professeur agrégé J. RÉGNIER

Pharmacien des Hôpitaux de Paris.

A qui je dois le sujet de cette thèse.

*En témoignage
de ma profonde reconnaissance et
de mon respectueux dévouement.*

*En hommage
de mon affectueux attachement.*

A Mademoiselle N. CHOUCROUN

Docteur ès Sciences.

Chargée de Recherches à la Caisse Nationale des Sciences.

*En hommage
de ma respectueuse reconnaissance.*

A Monsieur le Professeur M. JAVILLIER

Membre de l'Académie des Sciences,
Professeur à la Faculté des Sciences
et au Conservatoire des Arts et Métiers.

*Qui me fait l'honneur d'accepter
la présidence de cette thèse.*

*Hommage de respectueuse reconnaissance
pour son enseignement.*

A Monsieur L. PLANTEFOL

Maître de Conférences à la Faculté des Sciences.

A Monsieur A.-M. MONNIER

Maître de Conférences à la Faculté des Sciences.

*Qui ont bien voulu faire partie du jury
de cette thèse.*

Témoignage de respectueuse reconnaissance.

INTRODUCTION

D'une façon générale, il est très difficile de faire le départ entre un aliment et un toxique. Ce fait, souvent vérifié pour l'homme comme pour les animaux, apparaît encore mieux pour les êtres microscopiques dont la multiplication dépend de la présence, en quantité plus ou moins grande, de certaines substances.

Parmi les substances qui agissent sur les micro-organismes soit comme aliments, soit comme toxiques, il convient de citer les sels métalliques. L'influence toxique, antiseptique, de nombreux métaux est connue depuis longtemps.

Le rôle favorisant (1) de ces mêmes métaux présentés en quantités plus faibles semble avoir été mis en évidence

1. Par ce mot, nous voulons désigner l'action favorable qu'exerce une substance donnée sur la *multiplication* des bactéries. Nous ne préjugeons donc en rien de son action sur les autres processus (résistance au vieillissement, possibilité de régénération, capacité de sécrétions diastasiques, etc...) dont l'ensemble, avec la multiplication, caractérisent la vie des micro-organismes. D'autre part, par ce terme, nous ne préjugeons pas plus du rôle de cette substance dans le métabolisme général des bactéries. Certes, l'idée d'agent favorisant ou excitant, employée couramment par les auteurs étrangers, n'apporte aucune précision sur l'action qu'exerce la substance incriminée. Nous la préférons cependant. Malgré son sens vague, elle rappelle simplement le phénomène sans autre précision. Cela est préférable à l'emploi d'un autre mot tel que celui d'aliment dont le sens beaucoup trop précis ne peut pas s'appliquer directement aux phénomènes étudiés.

pour la première fois par PASTEUR. Ce savant a montré, en effet, la nécessité de la présence de cendres de levures dans le milieu de culture de ces micro-organismes et il a ainsi établi le rôle global de ces cendres, rôle indispensable dans le développement des levures.

*Un élève de Pasteur, RAULIN, dans ses belles recherches qui l'ont conduit à constituer le milieu de développement optimum de l'*Aspergillus niger* (1870), a mis en relief l'action utile jouée par certains sels. Parmi ceux-ci, le sulfate de zinc exerce une action favorisante très appréciable lorsqu'il est à une faible concentration, alors que, employé à des doses plus fortes, il manifeste une action toxique.*

*Les travaux systématiques de M. M. JAVILLIER (de 1907 à 1914) ont confirmé et étendu les conclusions de Raulin ; ils ont apporté la preuve définitive et indiscutable de cette importante notion, à savoir que des doses de zinc extrêmement petites améliorent considérablement des cultures d'*Aspergillus niger*. M. M. Javillier ne s'est pas contenté d'établir dans des conditions expérimentales très rigoureuses que « l'action favorisante du zinc est manifeste », mais il a apporté les premières notions précises sur le « mécanisme d'action du zinc ». Il a en outre montré que l'action de cet élément sur l'*Aspergillus niger* n'est pas spécifique : cet élément se montre favorable au développement d'autres *Hyphomycètes*, des levures et des végétaux supérieurs. M. Javillier a également mis en relief qu'aucun autre élément n'est capable d'exercer une action favorisante aussi puissante que le zinc.*

Cette notion si importante de l'action très utile de certains éléments comme le zinc est encore confirmée par les expériences de M. G. BERTRAND et M. M. JAVILLIER sur le manganèse. Ces savants ont mis en évidence que le manganèse est également « un adjuvant remarquable » de la végétation de l'Aspergillus niger; ils ont introduit une notion nouvelle très intéressante : « celle de l'action cumulative des éléments catalytiques », comme le zinc et le manganèse.

Il semble bien que l'on puisse rapprocher de ces phénomènes constatés sur les champignons, les résultats obtenus par ARNDT sur les animaux. Ainsi en rapprochant ces conceptions de ARNDT et celles de SCHULZ, tirées d'observations sur les levures, des auteurs étrangers ont-ils présenté sous forme de règle (1888) la théorie suivante : « Des excitations faibles stimulent l'activité vitale, des excitations moyennes la favorisent, des excitations fortes la suppriment ». Cette règle a été confirmée par de nombreuses observations. Signalons en particulier celles de Ch. RICHET qui datent presque de la même époque (1892 et années suivantes). Ce savant a, par exemple, observé que l'on peut accélérer la fermentation lactique en introduisant dans le milieu de culture de très faibles quantités de bichlorure de mercure, de chlorure de cuivre, de perchlorure d'or ou de perchlorure de platine. Il ressort donc de ces quelques observations qu'un même sel peut être très favorisant lorsqu'il est employé à des doses minuscules et agir d'une manière toxique lorsqu'il est utilisé à des concentrations plus grandes.

Nous ferons cependant remarquer que la plupart des expériences effectuées à ce sujet, l'ont été sur des champignons. Les résultats qui concernent les microbes paraissent provenir, en général, d'expériences moins rigoureuses. En effet, la pesée, après dessiccation, d'un mycélium qui s'est développé en présence ou en l'absence du sel étudié, fournit des renseignements suffisamment précis sur l'influence de ce sel. Il nous semble, par contre, bien insuffisant de contrôler l'influence d'une substance sur le croît bactérien par la mensuration d'un voile, l'intensité d'un pigment ou l'appréciation d'un trouble.

Quoi qu'il en soit, notre attention a été attirée par les faits que nous venons de signaler. Mais d'autres faits nous ont paru également intéressants. Parmi eux, notons l'influence de la grandeur de l'ensemencement sur la multiplication des microbes et l'action que pouvait avoir la charge électrique de ces germes sur leur développement.

Nous avons, d'autre part, en mains des techniques de mesure de la multiplication bactérienne, techniques mises au point avec précision et utilisées de façon courante dans notre laboratoire. Aussi avons-nous, sur les conseils de M. J. RÉGNIER, dans le laboratoire duquel nous avons déjà travaillé depuis quelques années, étudié l'influence de quantités variables de certains cations, plus ou moins fortement électrisés, sur la multiplication du bacille pyocyanique. Nous espérons ainsi constater des phénomènes différents, selon les quantités de sels métalliques introduits dans le milieu de culture, et mettre en évidence ces phénomènes quantitativement, d'une manière aussi précise que possible.

Nous espérons également pouvoir expliquer ces faits par la considération des charges des bactéries. C'est ainsi que nous avons été amené à présenter ce travail :

Dans la première partie, nous exposons d'abord les différents procédés de numération des microbes, puis, après en avoir fait la critique, nous examinons en détail les méthodes que nous avons employées. A ce propos, nous parlons de nos travaux concernant la technique du compte-microbes, technique que nous avons pensé utiliser dans nos expériences en raison de sa grande rapidité et de ses qualités pratiques. On verra pour quelles raisons nous avons préféré avoir recours, d'une part, à la méthode microscopique comparative de WRIGHT-FRIES et, d'autre part, à la technique de numération des colonies ayant poussé sur plaques de gélose après des dilutions convenables de l'émulsion-mère. Signalons simplement ici que la première technique donne le nombre de tous les germes visibles et que la seconde méthode fournit le nombre des microbes les plus résistants, capables de se reproduire après changement de milieu.

Dans cette première partie, nous avons jugé utile de donner un aperçu général de la multiplication microbienne. Cela nous a permis d'indiquer comment, d'après les travaux de divers auteurs, il est possible de décomposer la poussée bactérienne en différentes phases. Enfin, dans le dernier chapitre de cette partie, nous avons introduit quelques précisions sur le milieu de culture utilisé dans nos expériences : c'est-à-dire le bouillon peptoné dialysé, en indiquant son mode de préparation, quelques-uns de ses caractères et ses propriétés bactériologiques.

Notre seconde partie comporte d'abord un exposé bibliographique des principales observations qui se rapportent à l'action favorisante des petites doses et à l'action antiseptique des grandes doses. Après avoir parlé de la loi d'ARNDT-SCHULZ, telle qu'elle a été interprétée par divers auteurs, et donné un aperçu du phénomène dit « d'oligodynamie », nous avons signalé quelques-unes des hypothèses émises dans le but d'expliquer l'existence de doses minuscules favorisantes.

Le deuxième chapitre de cette partie est consacré à l'explication détaillée de nos expériences : description du mode opératoire utilisé et présentation des résultats obtenus sous forme de tableaux et de courbes. Pour terminer, nous commentons nos résultats concernant l'influence respective sur la poussée du bacille pyocyanique des cations expérimentés à diverses doses : lanthane, cérium, plomb, mercure et argent.

Enfin, nous avons tiré quelques conclusions et examiné s'il est possible de conserver à la règle d'ARNDT-SCHULZ la généralité d'application qu'on a voulu lui donner.

Dans la troisième partie, nous avons recherché :

1^o Si les charges électriques des microbes varient au cours de la multiplication microbienne normale, comme varie la courbe qui traduit cette multiplication;

2^o Si l'action excitante ou inhibitrice de certains sels, en particulier du nitrate de lanthane, est en relation avec une variation de la charge électrique des germes étudiés.

Au préalable, nous avons pensé qu'il était nécessaire de rappeler brièvement quelques notions sur la charge

électrique. En insistant sur ses travaux récents, nous montrons que Mlle CHOUCROUN a mis en évidence certains caractères importants de la charge, en particulier la différence fondamentale qui existe entre l'électrisation des particules inertes et l'électrisation des cellules vivantes.

Avant de parler de nos expériences, nous avons jugé utile d'exposer un certain nombre de méthodes d'électrophorèse, de décrire l'appareil utilisé dans nos recherches, de préciser les raisons pour lesquelles nous l'avons choisi et d'insister particulièrement sur le mode opératoire employé.

Pour terminer, après avoir mentionné les résultats obtenus, nous tirons de ceux-ci des conclusions qui infirment les deux hypothèses dont la vérification a fait précisément l'objet de cette troisième partie.

Ce travail, commencé au Laboratoire de Microbiologie de la Faculté de Pharmacie, a été poursuivi et terminé au Laboratoire de la Pharmacie de l'hôpital Ambroise Paré.

Nous remercions très respectueusement M. le Professeur RADAIS de nous avoir accueilli comme Moniteur aux travaux pratiques de Bactériologie et de nous avoir ainsi encouragé à la recherche scientifique.

Nous sommes particulièrement heureux de pouvoir témoigner notre profonde reconnaissance à M. J. RÉGNIER, Professeur agrégé, Pharmacien des Hôpitaux, à qui nous devons le sujet de ce travail. Pendant de nombreuses années, il n'a pas cessé de nous diriger et de nous prodiguer ses conseils. C'est avec une très affectueuse déférence que nous

lui en exprimons toute notre gratitude, et que nous l'assurons de tout notre dévouement.

Nous tenons également à remercier Mlle CHOUCROUN, Docteur ès Sciences, Chargée de recherches à la Caisse Nationale des Sciences, pour l'aimable accueil qu'elle nous a réservé. Nous n'oublions pas qu'elle nous a fait profiter de toute son expérience et de sa rare compétence dans un sujet si délicat. Elle nous a ainsi appris ses techniques d'électrophorèse qui lui ont demandé une longue mise au point. Qu'il nous soit permis de lui témoigner ici notre respectueuse reconnaissance.

Nos vifs remerciements vont également à M. le Professeur Ph. LASSEUR, de la Faculté de Pharmacie de Nancy, pour le très cordial accueil que nous avons trouvé dans son laboratoire, comme pour les précieux conseils qu'il a bien voulu nous prodiguer.

Nous éprouvons un égal plaisir à nous rappeler l'enseignement de M. L. DEVAL, Chef des travaux pratiques de Bactériologie à la Faculté de Pharmacie de Paris. C'est à la suite de ce premier enseignement pratique reçu de lui que nous nous sommes intéressé particulièrement à la bactériologie et c'est sous ses ordres que nous avons exercé pendant trois ans les fonctions de Moniteur de Bactériologie aux travaux pratiques de la Faculté de Pharmacie. Qu'il veuille bien trouver ici le témoignage de notre bien sincère et respectueuse reconnaissance.

Nous sommes également heureux de remercier amicalement Mlle S. LAMBIN, Docteur ès Sciences, Assistant de Bactériologie à la Faculté de Pharmacie, pour tous les

avis si compétents qu'elle a bien voulu nous donner pendant l'élaboration de cette thèse. Et nous n'avons garde enfin d'oublier Mlle A. LANDON dont l'aimable concours nous fut souvent utile.

C'est très respectueusement que nous remercions M. le Professeur JAVILLIER, Membre de l'Académie des Sciences, d'avoir bien voulu accepter la présidence de cette thèse. Nous sommes heureux de dire ici combien nous lui sommes redevable de l'enseignement que nous avons reçu de lui à la Faculté des Sciences.

Nous voudrions aussi lui témoigner toute notre vive reconnaissance pour les conseils qu'ils nous a donnés, particulièrement en ce qui concerne la rédaction de notre travail sur un sujet où son apport scientifique est si grand.

Qu'il nous soit permis également de remercier respectueusement M. L. PLANTEFOL et M. A.-M. MONNIER, Maîtres de Conférences à la Faculté des Sciences, qui ont bien voulu faire partie du jury de cette thèse.

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER

TECHNIQUES UTILISÉES D'UNE FAÇON GÉNÉRALE POUR L'ÉTUDE QUANTITATIVE DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE.

Il existe diverses méthodes proposées par de nombreux auteurs, permettant d'évaluer le nombre de microbes qui existent dans une suspension bactérienne.

Certaines consistent à estimer le volume ou le poids de la masse bactérienne; ce sont des mesures difficiles, longues et peu exactes; d'autres consistent à estimer le degré de l'opacité formée par la présence des éléments microbiens (méthodes néphéломétriques, méthodes opacimétriques).

Les méthodes les plus employées préconisent, soit la numération des microbes visibles dans un petit volume de culture, donnant ainsi la somme des microbes morts et vivants, soit la numération sur milieux solidifiés des seuls microbes pouvant résister à un changement de milieu.

Signalons enfin les méthodes basées sur l'activité biochimique des bactéries.

I. — Méthodes donnant le nombre total des microbes « morts et vivants » présents dans la culture.

a) MÉTHODES PERMETTANT D'ÉVALUER LA MASSE MICROBIENNE.

1° Mesure du volume des masses microbiennes :

Les microbes sont séparés du milieu de culture par centrifugation à grande vitesse (7.000 tours) pendant 15 minutes et collectés dans des tubes spécialement gradués. Le nombre de microbes se déduira du volume trouvé.

PAINE (363) en 1911, CARLSON (62) en 1913 utilisèrent cette méthode et SLATOR (455) en 1921 l'employa pour les levures. Cette méthode nous semble un peu trop approximative lorsqu'il s'agit d'obtenir des mesures précises. En effet, E. GRUNDMANN (197) étudiant cette technique, trouva qu'après centrifugation d'un bouillon de culture pendant 2 heures à raison de 3.500 tours par minute, il restait encore 20.000 germes par centimètre-cube, dans le liquide surnageant.

Pour avoir une mesure précise du volume de la masse microbienne, cet auteur employa des tubes établis d'après les données de ROSENTHAL, mais il obtint encore des résultats peu satisfaisants. Il avait pensé employer cette technique dans le but de dénombrer les espèces microbiennes qui poussent en amas (*Bacillus mycoides*) et dont la numération par une autre méthode n'est guère possible.

ERWIN REIMESCH (398) (1935), cherchant à établir une méthode générale de dénombrement des micro-organismes, proposa la technique suivante, dont voici les grands traits : collecter les germes par centrifugation, séparer le sédiment bactérien obtenu, le placer dans un tube non gradué et estimer la hauteur du précipité avec un microscope horizontal muni d'un micromètre oculaire. Il préconisa l'emploi de tubes à centrifuger dont les parois sont parallèles.

2^o *Mesure du poids des masses microbiennes :*

Cette méthode a beaucoup d'analogies avec la précédente ; il suffit d'établir le nombre de microbes correspondant à un poids donné. SABOURAUD (420) emploie cette méthode pour le titrage des vaccins à staphylocoques. Il procède à une première centrifugation, lave le culot en le remettant dans du sérum physiologique, centrifuge une seconde fois, enlève à la pipette toute l'eau qu'il est possible d'aspirer et pèse le résidu.

SABOURAUD estime que « le culot renferme sensiblement 500 millions de cocci par milligramme ».

F. VLÈS (493) centrifuge l'émulsion microbienne pendant 10 minutes (à raison de 6.000 à 7.000 tours à la minute), lave le culot bactérien à l'eau distillée et lui fait subir une nouvelle centrifugation de 10 minutes. Le résidu est desséché à poids constant à l'étuve à 110°.

3^o *Evaluation du trouble apporté aux milieux liquides par la masse microbienne :*

Cette méthode est employée par tout bactériologiste désireux d'estimer grossièrement et rapidement la teneur en microbes d'une culture.

De nombreux auteurs ont apporté leur contribution dans le perfectionnement de ce procédé empirique. Déjà en 1902, BOLAND (43) compara le trouble des cultures à une opacité-étalon. DAVISON (106) en 1916 estima la visibilité d'une grille à travers le tube d'émulsion à titrer. HARVEY (215) en 1919, proposa une éprouvette dont le fond est muni d'un signe visible. GATES (180) en 1920 fit varier la densité de l'émulsion bactérienne jusqu'à la limite de visibilité d'une anse de platine plongée dans le liquide.

D'autres auteurs ont donné des techniques beaucoup plus intéressantes et plus précises. DREYER, DUNCAN et GARDNER (124) en 1916 comparèrent à un tube témoin, une série de tubes contenant la suspension microbienne et des dilutions progressives de celle-ci. En 1918, DERNBY et AVERY (108) employèrent le néphélémètre de KOBER (269) et prirent comme étalon des suspensions titrées de pneumocoques morts. En 1919, AVERY, GLENN et CULLEN (13) eurent recours à cette méthode pour rechercher la concentration en ions H la plus favorable au développement du pneumocoque en présence d'hydrates de carbone. PORCELLI-TITONE (378) et GOSIO (190) en 1917 employèrent un tube plongeur que l'on peut déplacer jusqu'à la limite de visibilité d'un signe. En 1921, LÉOPOLD ROBERT (411) imagina un diaphanomètre lui permettant de comparer des émulsions avec une suspension microbienne étalon : dans ce but il amène à égalité les troubles de ces suspensions, par addition d'eau salée ou fluorée. La même année, HANS HECKSCHER (219) proposa également une technique néphélométrique. Il compara l'émulsion étudiée avec de nombreux tubes étalons, dont les concentrations vont de 10 en 10 pour 100. D'après lui, on obtient la *valeur néphélométrique* avec une erreur qui ne dépasse pas 5 pour 100...

Ce fut FRED VLÈS (493) qui perfectionna le mieux cette méthode et en fit l'étude la plus complète. Pendant la guerre, au Val-de-Grâce, il mit au point un appareil opacimétrique permettant de faire un titrage rapide et précis du vaccin antityphique que préparait H. VINCENT. Il montra que, dans de telles

expériences, il ne fallait pas employer la lumière blanche, mais une lumière monochromatique (de préférence vers l'extrémité rouge du spectre).

L. A. BARNES (19) apprécia la croissance bactérienne en comparant le trouble des diverses cultures avec celui d'un tube de bouillon simple. A cet effet il utilisa l'appareil de GATES (180). W. ESTOR (138), en 1927, employa le « turbidomètre » de DOLD dans ses recherches sur la croissance des bactéries.

En 1932, M. FAGUET (140-141) proposa une méthode photométrique, basée sur l'emploi de la cellule photo-électrique et sur l'existence d'un rapport sensiblement constant entre l'intensité lumineuse et le courant développé. Il pouvait ainsi étudier la multiplication microbienne en utilisant l'opacité progressive d'un bouillon de culture ensemencé avec un microbe quelconque. L'auteur employait une source lumineuse monochromatique d'intensité constante. Cette source traversait le bouillon avant de frapper la cellule photo-électrique montée dans l'étuve, et la cellule enregistrait la variation d'opacité de la culture. Il en résultait des variations de courant de la cellule photo-électrique qui étaient enregistrées par le spot d'un galvanomètre et inscrites sur un papier sensible et mobile. Faguet étudia et construisit une courbe de multiplication du bacille coli. Il nota que, pour toutes les expériences, les courbes du bacille coli étaient toujours superposables, ce qui lui fit écrire : « Dans les mêmes conditions expérimentales, un microbe d'espèce déterminée donne toujours la même courbe de croissance. »

Il étudia ensuite un autre bacille : le ferment lactique. Les courbes étaient bien différentes de celles du bacille coli, mais toutes celles concernant le ferment lactique étaient également superposables, ce qui lui fit conclure : « Chaque courbe est spécifique d'un microbe déterminé ».

En 1935, M. Faguet (142-143) publia deux nouvelles notes où il décrit de nouveaux perfectionnements apportés à son montage et où il appliqua sa méthode au diagnostic du bacille d'Eberth, des paratyphiques A et B, et du bacille coli. Il aboutit à des conclusions identiques, à savoir que l'on obtient des courbes semblables avec les mêmes points caractéristiques, pour chaque microbe ; cela lui permit encore de dire : « Le diagnostic photométrique concorde avec le diagnostic bactériologique ».

A ce sujet, il convient de signaler que la méthode dont nous

venons de parler, semble avoir été introduite en 1927 par ANDREJEW (8) pour des usages bactériologiques. En effet, cet auteur, se basant sur les travaux de A. LOTTERMOSER (311) et de KALITIN (259) qui utilisèrent une méthode basée sur ce principe afin d'estimer la concentration de suspensions colloïdales, employa celle-ci pour déterminer la concentration d'émulsions de *Staphylococcus albus*. Pour donner une signification à ses résultats, il les compara avec le nombre et le poids des microbes contenus dans des émulsions préalablement titrées. Il obtenait le nombre des microbes au moyen de la méthode des colonies développées sur plaques de gélose et il déterminait leur poids en pesant la masse microbienne desséchée (2×10^9 microbes pèsent 0,000425 gr.).

Mentionnons encore que E. S. AWTONOMOVA et T. A. STESSEL (14) décrivirent également une méthode néphélométrique comprenant l'emploi d'une cellule photoélectrique. Ces auteurs empruntèrent d'ailleurs l'appareil d'ANDREJEW (8). D'après eux, cette méthode semble plus exacte que celles qui ont été employées jusqu'à présent. Son avantage principal provient de ce que les difficultés qui sont liées au choix d'un standard et, par conséquent, aux fautes de mesures inhérentes, sont ici écartées. Cette technique permet de titrer les vaccins en réalisant une grande économie de temps.

W. SARAFANOFF (423) utilisa le colorimètre de HELIGE pour apprécier la valeur de la croissance de la levure. W. LIESE (303) employa le néphélomètre de KLEINMANN (267) pour connaître non seulement le nombre de microbes par centimètre cube, mais encore la valeur de leur surface individuelle. Il réussit même à remplacer la suspension étalon de staphylocoques par une suspension d'un trouble constant préparée à l'aide de glycogène dissout dans l'eau.

4° Evaluation de la quantité de colorant absorbée par la masse microbienne :

ZELIKOW (524) en 1906 mesura la quantité de colorant (fuchsine) absorbée par les éléments d'une suspension bactérienne. A cet effet il détermina la concentration du colorant avant et après l'absorption au moyen d'un colorimètre de DUBOSC.

L'exactitude d'une telle technique semble difficile à admettre. Les phénomènes d'adsorption dont dépend la quantité de colo-

rant fixée par les microbes, sont fort complexes et sont influencés par plusieurs facteurs, parmi lesquels la nature du milieu et la vitalité des bactéries (vitalité, âge, etc.).

5^o *Critique de ces différentes méthodes :*

Malgré les perfectionnements et la précision obtenus, les méthodes précédentes qui visent l'évaluation de la masse microbienne (par mesure du volume, du poids, de l'opacité bactérienne) présentent quelques faiblesses :

a) L'emploi de la centrifugation peut produire une erreur par défaut parce que :

1^o Les lavages à l'eau distillée peuvent provoquer une bactériolyse de quelques éléments microbiens.

2^o La texture et la densité des bactéries peuvent être modifiées profondément et empêcher ainsi une centrifugation complète. F. VLÈS (494) estime que cette erreur est considérable et atteint 25 pour 100. Il serait donc préférable de remplacer les lavages à l'eau distillée par des lavages à l'eau physiologique, bien que nous ne soyons pas certains que ce sérum physiologique (dont le titre a été établi vis-à-vis des hématies) convienne aussi bien à la conservation des bactéries.

A. DUTHOIT (126) et d'autres auteurs ont en effet montré qu'après un contact assez long, les microbes sont détruits aussi bien par l'eau distillée, que par l'eau salée physiologique. H. SCHMIDT (430) a observé que la plupart des bactéries sont détruites au bout de 7 heures par le sérum physiologique.

D'une façon générale, on n'isole jamais une masse microbienne parfaitement pure, car :

a) Les microbes adsorbent toujours une certaine quantité de substances salines ou colloïdales, qu'ils abandonnent difficilement.

b) Les bactéries ont leur volume, leur poids, leurs propriétés optiques qui varient avec leur état d'hydratation.

Malgré les grands progrès réalisés récemment par les méthodes opacimétriques, notamment par l'emploi de cellules photoélectriques, nous formulons encore certaines objections :

Ces méthodes mesurent indifféremment l'opacité de tous les éléments en suspension, c'est-à-dire les germes eux-mêmes

avec des particules étrangères d'origine diverses (précipités de microbes incomplètement lysés, substances colloïdales ou salines adsorbées par ces microbes, etc...).

b) Au cours du développement microbien, il se produit des variations morphologiques des individus microbiens qui ne pourront que fausser les mesures opacimétriques, par exemple des modifications de longueur des bactéries, comme l'ont observé HENRICI (226), J. RÉGNIER et A. KAPLAN (394), des variations de gonflement et de transparence, dues aux modifications physico-chimiques du milieu, comme l'ont montré Ph. LASSEUR et M^{lle} A. DUPAIX (286).

Ces méthodes qui sont très bonnes et très pratiques pour titrer des vaccins, préparés par émulsion de cultures sur gélose, ne conviendront plus à nos propres recherches, où nous voulons suivre, pendant plusieurs jours, la multiplication microbienne dans un milieu de culture liquide, en la soumettant de plus à l'influence de certains sels. Nos mesures seraient, en effet, rapidement entravées par les troubles, les précipités produits dans le milieu même par suite de l'activité bio-chimique des bactéries et (en ce qui nous concerne) de l'action des sels dont nous étudions l'influence, sur les peptones constituant notre milieu. D'ailleurs certains auteurs ont été arrêtés par ces difficultés, notamment DERNBY et AVERY (108), qui n'ont pu employer leur néphélémètre que dans une zone de PH très restreinte, comprise entre 6 et 8.

b) MÉTHODES MICROSCOPIQUES PERMETTANT LA NUMÉRATION DES ÉLÉMENTS MICROBIENS.

Il existe deux types de méthodes :

Le premier type comprend les méthodes où il est fait une numération *directe* de tous les microbes contenus dans un volume bien déterminé de suspension microbienne, sur une lame ou dans une chambre de numération.

Le second type est caractérisé par une méthode de numération microscopique *indirecte* où l'on détermine, dans un mélange d'émulsion bactérienne et d'émulsion titrée d'éléments figurés assez gros, la proportion relative des bactéries et des éléments figurés.

1^o *Evaluation du nombre de microbes par numération microscopique directe :*

Numération au microscope, après coloration, du nombre total de microbes contenus dans une quantité connue de suspension bactérienne aussi faible que possible.

Ce fut KLEIN (264) en 1900, qui apporta la première mise au point de ce procédé : ayant remarqué que les spores des bactéries étaient beaucoup plus sensibles aux antiseptiques en milieu humide qu'en milieu sec, il formula l'hypothèse que ces organismes inférieurs devaient fixer les matières colorantes également bien plus énergiquement en milieu humide qu'en milieu sec. Ses expériences confirmèrent ce point de vue. Dans ses numérations microbiennes, il appliqua cette technique. Voici comment il procédait : Nous empruntons ses propres termes :

« Dans un verre de montre, on place une quantité connue
« (par exemple 1/2 cm³) d'une culture liquide ou d'une émulsion
« de culture solide dans l'eau physiologique et une quantité égale
« de violet de gentiane en solution aqueuse anilinée. Les deux
« liquides sont mélangés pendant quelques minutes à l'aide d'une
« anse de platine. Après 2 ou 3 minutes, les bactéries sont déjà
« très intensément colorés. A ce moment, on prélève une partie
« connue du mélange à l'aide d'une anse de platine *jaugee* et on
« l'étale uniformément sur une lamelle. On laisse la préparation
« sécher à l'air; on la passe 2 ou 3 fois à la flamme et on l'inclut
« dans le xylol ou le baume du Canada. Les bactéries apparais-
« sent, au microscope, fortement colorées. L'examen de la sur-
« face totale de la lamelle n'est pas nécessaire. Il suffit d'effectuer
« la numération sur une cinquantaine de champs microscopiques
« et de prendre la moyenne des chiffres trouvés. Par un simple
« calcul, en considérant la capacité de l'anse de platine, la surface
« de la lamelle et la surface du champ microscopique, on connaît
« le nombre de bactéries contenues dans un centimètre-cube de
« la suspension microbienne. »

HEHEWERTH (221) en 1901 perfectionna encore la méthode de KLEIN. Il conseilla d'étaler le liquide rapidement, en évitant d'atteindre la dessiccation. Il donna en outre des précisions sur la coloration et la surface des lamelles à employer, celles-ci correspondant à des anses de platine de capacité définie.

EIJKMANN (134) en 1904, recherchant la cause de l'arrêt

brusque de la multiplication microbienne intensive au bout de quelques jours, employa à la fois une technique dénombrant les bactéries vivantes, et une technique donnant le nombre de germes visibles. En ce qui concerne cette dernière, il étendit sur une lame une quantité exactement mesurée de culture en bouillon gélatiné. Après solidification, puis durcissement de la gélatine au formol, il colora au bleu de méthylène et deshydrata à l'alcool. Il effectua la numération après inclusion dans le baume du Canada.

THONI et THAYSEN (482) en 1915 firent de même pour la numération du bacille tuberculeux, et pratiquèrent une coloration par la méthode de BURRI à l'encre de Chine.

HUGO SELTER (441) en 1916 utilisa la méthode indiquée par MULLER (343) pour la numération des germes de l'eau. Celle-ci ressemble, à quelques détails près à la méthode de KLEIN. BREED et BREW (46) en 1916 appliquèrent également une méthode semblable à la numération des bactéries du lait.

KLEIN (265) en 1916 reprit et perfectionna sa méthode pour le titrage des vaccins. HANS HECKSCHER en 1921, s'inspira des mêmes principes, mais au lieu d'une anse jaugée, il employa une pipette compte-goutte ou à graduation capillaire.

En 1923, ARTHUR HENRICI (224) proposa une nouvelle et intéressante technique qui lui permettait de distinguer les cellules les unes des autres selon l'intensité avec laquelle elles prenaient les matières colorantes.

Cependant, ces procédés gardent, quels que soient leurs perfectionnements, à leur origine, une cause d'erreur qui peut être très importante, et qui provient de l'emploi « *d'anses de platine jaugées* ». La petite quantité de liquide prélevée est supposée rigoureusement constante quelle que soit la nature de la suspension microbienne; et cela nécessite des anses de platine très exactement jaugées. Or, il est très difficile d'obtenir des anses rigoureusement calibrées et il n'est pas certain que la totalité de la prise d'essai soit déposée sur la lame. Par suite du très petit volume prélevé, la moindre erreur prendra de grandes proportions. Il ne faut pas oublier non plus l'influence des qualités physiques des liquides utilisés, telles la viscosité et la tension superficielle, sur la quantité des suspensions microbiennes prélevées. La tension superficielle, par exemple, varie avec les différents milieux de culture, et avec le même milieu varie encore

suivant l'évolution de la multiplication microbienne. Ce fait a été signalé par KOPACZEWSKI (271) pour la tension superficielle et a été retrouvé par R. DAVID (104).

Ces méthodes peuvent rendre de grands services pour le titrage des vaccins, mais introduisent de trop grandes causes d'erreur lorsqu'il s'agit de suivre la poussée bactérienne avec précision.

HENRIQUES (227) en 1923 améliora ces méthodes de numération microscopique directe basées sur le principe de KLEIN. Il chercha à obtenir une répartition homogène sur les lames lors de la dessiccation des suspensions. Au lieu d'une addition de gélatine liquéfiée préconisée par certains auteurs (EIJKMANN (134), THONI et THAYSEN (482), KLEIN (265)), il ajouta un « *colloïde protecteur* » : gomme arabique (0,5 à 2 %) ou peptone (2 %). Cette addition « *stabilisait* » les suspensions à étudier et permettait l'emploi de pipettes graduées très fines; le colloïde régularisait l'aspiration et le rejet de la suspension microbienne et s'opposait à la formation dans la pipette d'un courant central plus riche en bactéries. Les mesures de très petits volumes de suspensions microbiennes peuvent être ainsi réalisées plus exactement.

2^o *Evaluation du nombre des microbes au moyen d'une cellule compte-microbes :*

L'emploi des chambres de numération permet le dénombrement des microbes dans un volume de suspension microbienne très petit et absolument précis. Ces appareils ressemblent à des hématimètres, modifiés en vue des dimensions réduites des éléments microbiens.

Voici le principe de ces appareils : sur la surface exactement déterminée d'une lame rigoureusement plane, est gravé un réseau délimitant de petits carrés de dimensions connues. Ce réseau est entouré d'une partie évidée permettant l'écoulement de l'excès du liquide étudié, puis d'un rebord de hauteur exactement mesurée. Une lamelle parfaitement plane posée sur ce rebord délimite une petite chambre ou « cellule » de volume exactement déterminé, ayant pour base le réseau gradué. Bien qu'apparemment très simple, la mise au point de cette technique se heurte à de très grandes difficultés. La principale provient de la

lenteur de sédimentation des bactéries sur le fond gradué de la lame. Ce dépôt est même incomplet, il se forme plusieurs plans de germes et il y a impossibilité de voir à la fois le quadrillage gravé sur le fond et toutes les bactéries de la suspension. Les constructeurs ont donc été amenés à diminuer au maximum la profondeur de la cellule. D'ailleurs, cette diminution de profondeur présente l'avantage d'augmenter la distance libre pour l'objectif, ce qui diminue les risques de rupture des lamelles par l'emploi nécessaire d'objectif à sec. L'exactitude des résultats obtenus dépend donc du degré de précision des appareils, et leur réalisation est des plus délicates.

En 1914, E. GLYNN, M. POWELL, A. REES, et G. LISSANT COX (189), dans une comparaison des diverses méthodes de numération microbienne, donnèrent les caractéristiques des cellules utilisées pour la numération directe des bactéries. Ils recommandèrent l'emploi d'une cellule de 0 mm. 02 (1/50 de millimètre) de profondeur, soit une profondeur cinq fois plus petite que celle que présentent les hématimètres. La lamelle employée doit être parfaitement plane au point de vue optique et suffisamment mince. Pour rendre la numération plus aisée, ces auteurs teintèrent les bactéries avec une solution faible de thionine phéniquée.

En 1916, LIEBREICH (302) construisit une « chambre de numération » d'une faible profondeur, permettant ainsi l'emploi de l'objectif à immersion.

Dans les années suivantes de nombreux auteurs utilisèrent encore de véritables hématimètres. C'est ainsi que FRED VLÈS (493) en 1921 gradua ses appareils opacimétriques à l'aide d'un hématimètre Thoma-Zeiss et d'un compte-microbes « Angus ». HENRICI (223), en 1921, pour la numération des bactéries et la détermination de leur longueur, employa également un hématimètre. CH. HOLLANDE et G. CRÉMIEUX (238) en 1928 utilisèrent un hématimètre de MALASSEZ pour la numération directe du bacille tuberculeux. HUEPPE, LAFAR et WINTERBERG (243) et d'autres auteurs (1930) utilisèrent également le dispositif de THOMA-ZEISS ou celui de K. BURKER (57). De même, SALIMBENI (421), ne disposant pas d'un compte-microbes spécial, utilisa d'abord un hématimètre ordinaire dont chaque carré correspond à 1/4000 de millimètre cube. Par addition d'eau formolée à

1 %, colorée avec de la fuchsine, il dilua l'émulsion microbienne de façon à avoir au plus 10 germes par carré.

Puis des fabricants spécialisés se mirent à construire des appareils précis. En France, SALIMBENI fit construire par la maison Jouan une cellule compte-microbes d'un maniement facile dont nous donnerons plus loin la description.

A l'étranger, en dehors de la lame « Angus » déjà citée, signalons le dispositif de HELBER-GLYNN, dont s'est servi HORWATH, (240) et celui de SCOTT et SCOTT, indiqué par PRAUSNITZ (379) et dont la hauteur de cellule est 0 mm. 01.

Nous avons utilisé un des modèles les plus récents, construit par la maison Reichert de Vienne sur les données de STEINER (466) et que nous décrirons également plus loin en détail; il se distingue des appareils précédents par une hauteur encore plus faible de la cellule : 1/100 de millimètre, c'est-à-dire la moitié de la hauteur des autres compte-microbes et le 1/10 de la hauteur des hématimètres.

Il convient encore de signaler une technique particulière, mise au point par TROESTER (488) en 1922. Il conseilla d'examiner les bactéries sans coloration, mais sur *champ obscur*, afin d'éviter la cause d'erreur provoquée par les différences de teintes des germes colorés. Il employa une cellule ayant une profondeur de 1/20 de millimètre (0 mm. 05), une lame porte-objet d'une épaisseur de 0 mm. 9 et une lamelle bien plane d'une épaisseur de 0 mm. 2. Le fond de la cellule ne portait pas de graduation micrométrique gravée, mais il employait un filet micrométrique introduit dans l'oculaire. Le quadrillage restait donc toujours visible, et il était ainsi possible de compter toutes les bactéries situées à des niveaux différents. La profondeur de la cellule importait donc moins.

Enfin, WAMOSCHER (495) effectua lui aussi des numérations dans le champ obscur à l'aide du condensateur de PETERFI fabriqué par ZEISS; et WOHLFEIL (516) préconisa également l'emploi de cette technique.

Nous avons étudié cette méthode de numération directe à l'aide de diverses « chambres compte-microbes » en vue de l'utiliser dans nos essais. Nous indiquerons plus loin, en exposant les techniques de numération employées, les résultats trouvés et nous les comparerons avec ceux que donnent les autres méthodes.

3^o *Evaluation du nombre des microbes par numération microscopique comparative :*

C'est en 1902 que le bactériologiste anglais WRIGHT (519) utilisa cette méthode pour la première fois et la préconisa spécialement pour le titrage des vaccins. En voici le principe : connaissant le nombre d'hématies contenues dans 1 mm³ de sang et mélangeant intimement un volume de sang avec un égal volume de suspension microbienne à titrer, si, après étalement sur lame et coloration, on détermine la fréquence relative des bactéries et des globules sanguins, on obtient facilement, par une simple règle de trois, la quantité de microbes contenus dans 1 mm³ de suspension microbienne

Pour effectuer cette numération comparative, WRIGHT mélangeait 0 cm³ 5 de sang humain normal avec un volume égal de la suspension microbienne à titrer. Il étalait sur une lame une goutte de ce mélange microbe-sang, la laissait sécher, la fixait par une solution de bichlorure de mercure et la colorait. Il examinait alors un certain nombre de champs microscopiques dans lesquels il déterminait le nombre moyen de bactéries (a) et le nombre moyen d'hématies (b). Admettant, en outre, que le sang contenait, pour une personne bien portante, 5 millions de globules rouges par millimètre-cube, pour calculer le nombre (x) de microbes par millimètre-cube d'émulsions bactériennes, il appliquait la formule :

$$\frac{a}{b} = \frac{x}{5.000.000} \text{ d'où } x = \frac{a \times 5.000.000}{b}$$

Cette technique très ingénieuse avait cependant un point faible. WRIGHT admettait un nombre constant : 5 millions d'hématies par millimètre-cube de sang. Mais ce nombre varie quelquefois dans de fortes proportions suivant les individus, et, pour le même individu, selon les heures de la journée. Il faut donc titrer le nombre d'hématies pour chaque prélèvement de sang, ce qui rend la méthode beaucoup plus longue. D'autre part, il se produit, au cours des manipulations, des coagulations très gênantes pour la numération. C'est ce qui amènera ALLEN (7) à proposer l'addition au sang d'une certaine quantité de sérum physiologique, ou d'une solution de citrate de soude à 1,5 %.

Une autre cause d'erreur de cette méthode réside dans la bien plus grande richesse du mélange microbe-sang en hématies qu'en bactéries, le sang normal étant plus chargé en hématies que les suspensions microbiennes destinées à la préparation des vaccins. En 1921, GEORGES DREYER (125) substitua au sang humain une émulsion de globules sanguins de poule, et préconisa d'amener cette émulsion à un taux voisin de celui de l'émulsion microbienne.

Le grand ennui de l'emploi du sang était son manque de conservation. Aussi FRIES (160) proposa-t-il en 1921 de remplacer les hématies par des cellules de levure de bière, éléments figurés assez gros, ne permettant aucune confusion avec les bactéries. Cet auteur employa une émulsion de levures titrant 20 à 30 millions de cellules par centimètre-cube, et faite avec une solution physiologique contenant 0,9 % de chlorure de sodium et 5 % de phénol.

Cette méthode comparative subit les critiques de nombreux auteurs et en particulier celles de H. DOLD (121). Il est à remarquer que, dans cette technique, on effectue successivement deux opérations susceptibles de causes d'erreur : une numération d'hématies ou de cellules de levures à l'hématimètre, puis la numération proprement dite sur lame après fixation et coloration de ces mêmes éléments de comparaison.

HARRISSON (213) fit remarquer que malgré la fixation, une quantité variable d'hématies et de bactéries, pouvait être entraînée par le lavage des lames après coloration. Cette remarque mérite d'être prise en considération : Il faut prendre de grandes précautions dans la coloration et le lavage des préparations. SOMMER (457) en 1924 voulut éviter cette cause d'erreur en ajoutant directement au mélange levures-microbes, une solution colorante ; il étalait une goutte du mélange coloré, le laissait sécher et l'examinait sans fixation ni lavage. LEISHMAN (296) pensa qu'un certain nombre de microbes étaient susceptibles d'être rapidement lysés par le plasma sanguin. SOLLMAN vit une cause d'erreur provenant de l'action des agglutinines normales du sang sur les bactéries et d'autres auteurs firent remarquer qu'un certain nombre de bactéries dissimulées sous les globules échappaient à la numération.

D'autres chercheurs enfin, attirèrent l'attention sur l'importance de la régularité de l'étalement. En effet, l'exactitude de

cette méthode dépend essentiellement d'une répartition uniforme des microbes et des hématies sur la lame. A cet égard, il faut renoncer à l'emploi d'une lame ou d'une lamelle pour effectuer les étalements. REES (189) a montré que les bactéries adhèrent plus fortement que les globules sanguins à la lamelle utilisée pour les étalements; et il a établi notamment que le rapport des microbes aux hématies était souvent 2 à 3 fois plus grand dans la petite goutte restant sur la lamelle qui avait servi à l'étalement. De plus, l'emploi d'une lame ou d'une lamelle pour l'étalement rend celui-ci hétérogène; dès le début, les bactéries, plus petites, sont laissées en arrière, tandis que la lame entraîne plus facilement les hématies; la préparation s'enrichit donc en hématies vers la fin de l'étalement. Enfin, dans l'emploi du sang, les microbes peuvent se mêler aux plaquettes sanguines dont il est difficile de les distinguer.

Nous exposerons plus loin en détail la pratique de cette méthode et nous indiquerons pourquoi nous avons été amené à l'employer dans nos essais personnels.

Toutes les méthodes dont nous venons d'exposer les principes (évaluation du volume ou du poids d'une masse microbienne, mesure de la perte qu'une suspension bactérienne fait subir aux rayons lumineux qui la traversent, numération directe des microbes après étalement et coloration, ou par l'emploi d'une cellule compte-microbes, numération comparative) nous donnent l'ensemble des bactéries *mortes et vivantes*. Nous allons examiner maintenant d'autres méthodes permettant de déterminer le nombre des bactéries appelées par les anciens auteurs : « *bactéries vivantes* » et qui sont en somme les bactéries *les plus vigoureuses*, capables d'être transplantées et de se développer sur d'autres milieux.

II. — Méthodes donnant le nombre des microbes capables de se reproduire après ensemencement sur un milieu nutritif différent de leur milieu originel (microbes appelés « vivants » par les auteurs).

Dans un premier procédé, très fréquemment employé, on suppose qu'il est possible par des dilutions suffisantes de séparer les bactéries les unes des autres à un tel point que toute multiplication microbienne (trouble d'un bouillon, apparition

d'une colonie) puisse être considérée comme provenant *d'une seule bactérie « vivante »*.

Un second procédé plus récent est basé sur la possibilité de distinguer au microscope les bactéries mortes des bactéries vivantes.

Ces deux procédés dénombreront des bactéries de qualités différentes. Le second procédé donnera le nombre des bactéries vivantes dans le milieu originel, tandis que le premier ne nous indiquera que le nombre de bactéries capables de se reproduire en « subcultures ». En effet, un microbe, capable de se multiplier dans le milieu où il est né, peut très bien ne plus se multiplier dans un autre milieu; et le nombre des microbes capables de se développer en « subcultures » variera, ainsi que l'a montré HEHEWERTH, avec les différents milieux de réensemencement. C'est pourquoi le terme *microbes « vivants »* est impropre et qu'il serait plus logique d'employer la dénomination suivante : *« microbes capables de se reproduire dans tel ou tel milieu »*.

1^o *Numération après dilution et ensemencement en milieu liquide.*

C'est PASTEUR qui exposa le premier le principe de cette méthode en 1860, alors qu'il recherchait le nombre de microbes contenus dans l'air. KLEBS (263) en 1873, LISTER en 1878 et MIQUEL (331) en 1879 perfectionnèrent ce procédé.

Voici les deux principes de cette méthode :

1^o Il faut d'abord obtenir des suspensions bactériennes dans lesquelles les bactéries sont isolées les unes des autres, à la suite de dilutions connues et d'agitations successives.

2^o Si on ensemence de telles dilutions, en quantités égales, dans divers tubes contenant un milieu nutritif liquide, il se manifeste une poussée microbienne dans un certain nombre de ces tubes. Quand 15 à 20 % des tubes ainsi ensemencés donnent lieu à une poussée, ces cultures sont presque toujours des cultures pures. Connaissant le nombre de dilutions, il est très facile de calculer le nombre de bactéries dans l'émulsion primitive. On applique ces principes à la numération du colibacille dans l'eau, dans une technique mise au point par M. le professeur RADAIS.

D'autres auteurs reprirent les principes de MIQUEL et les utilisèrent pour les analyses d'eau et la numération du bacille

coli ; citons : MAC CRADY (96) en 1915, WOLMAN et WEAVER (518) en 1917, STEIN (464) en 1919, GREENWOOD et YULE G. UDNY (193) en 1917, MAC CRADY (97) en 1918.

Ces techniques sont d'un grand intérêt parce qu'elles ont permis d'obtenir des cultures pures et de pratiquer des analyses bactériologiques de l'air, du sol et des eaux.

2° Numération après dilution et ensemencement sur milieux solidifiés.

C'est KOCH, en 1884, qui eut l'idée de cette méthode. Il mélangeait les suspensions microbiennes à des bouillons nutritifs gélatinés liquéfiés et coulait ces mélanges sur des plaques de verres flambées. Il mettait ces plaques à l'étuve à 24° et comptait ensuite les colonies à l'œil nu ou à la loupe.

De nombreux auteurs étudièrent et perfectionnèrent cette méthode. Les uns apportèrent des améliorations pour permettre un meilleur développement des colonies et une plus grande protection de la culture. Parmi ceux-ci, PÉTRI employa des cristallisoirs emboîtés les uns dans les autres qui portent son nom. Certains auteurs remplacèrent la gélatine par la gélose, ce qui leur permit d'employer la température de 37° pour le développement des colonies et d'éviter ainsi la liquéfaction de la gélatine produite par certaines bactéries.

MILLER (329), en 1894, proposa de retourner les boîtes de Pétri, de façon que le milieu nutritif soit en haut (ceci pour éviter la condensation de la vapeur d'eau sous le couvercle des boîtes).

BUCHNER (53), puis EIJKMANN (134) en 1904 signalèrent la nécessité d'assurer au milieu de culture une épaisseur uniforme. Dans ce but, ils versaient la gélose ensemencée sur une couche préalablement coulée de gélose stérile. PENFOLD (367), en 1914, coula au-dessus de la gélose ensemencée une troisième couche très mince de gélose stérile, de manière à obtenir des colonies légèrement incluses dans la gélose, petites, et pouvant se développer en grand nombre sans devenir confluentes.

M. STEPHENSON (467), dans son étude sur le métabolisme bactérien, trouve que le meilleur moyen d'estimer la multiplication microbienne est ce qu'il appelle la « *numération vitale* ». Celle-ci consiste à prélever un petit volume de la culture et à le trans-

porter dans un volume connu d'eau stérile, de solution de Ringer ou d'un autre liquide qui n'est ni nourrissant, ni toxique. Après des dilutions successives dans le « *diluant* » choisi, on prélève un volume connu et on l'ensemence dans une gélose nutritive stérile qui est, soit coulée en plaque, soit roulée en feuille mince à l'intérieur d'un tube à expérience (méthode du tube roulé). Après incubation, chaque cellule viable est représentée par une colonie, et du nombre de celles-ci on déduit le nombre d'organismes de la culture.

Certains chercheurs proposèrent des modifications pour éviter d'effectuer de trop grandes dilutions de la suspension microbienne à étudier. Dans ce but ils employèrent deux procédés : soit l'ensemencement des plus petites quantités possibles d'émulsion à étudier, soit la numération du plus grand nombre possible de colonies qui se sont développées sur boîtes de Pétri. C'est pourquoi, dans le premier cas, les auteurs créèrent des appareils de *microensemencement* précis, tels que pipettes capillaires, anses standard, etc..., et dans le second cas ils utilisèrent des dispositifs microscopiques permettant la numération de colonies fort nombreuses dans une portion exactement délimitée de la surface des boîtes. Parmi les auteurs cherchant à ensemençer de très petites quantités de suspensions microbiennes, citons : JANET LANE CLAYPON (84) qui, en 1909, proposa l'emploi d'une pipette capillaire dont chaque goutte avait un volume de $0\text{ cm}^3\text{ }02$, MISS CHICK (76) qui en 1912 ensemença également des gouttes très petites, DICHTL (117) qui utilisa des pipettes capillaires spécialement étalonnées. En 1920, GRAHAM SMITH (456) employa, comme l'avait déjà fait HEHEWERTH (221), une anse standard contenant $0\text{ cm}^3\text{ }01$ de liquide.

Parmi les auteurs cherchant à dénombrer microscopiquement un très grand nombre de colonies, citons le bactériologiste français PROUST (381) en 1884. Quelques années plus tard, BUCHNER, LONGARD et RIEDLIN (53) proposèrent de compter au microscope les colonies situées dans 10 à 30 champs microscopiques et de prendre la moyenne des résultats obtenus. Connaissant la grandeur de chaque champ et la surface totale de la plaque, il était simple de calculer le nombre total de colonies développées sur toute la culture. BRUNNER et ZAWADZKI (48), en 1893, utilisèrent la loupe et comptèrent un certain nombre de secteurs de surface déterminée. F. LAFAR (281) divise la surface de la

boîte de Pétri en portions de 1 centimètre carré. En 1895, MAX MULLER (343), et surtout MAX NEISSER (349) comparèrent les résultats obtenus en employant soit la loupe, soit le microscope. Ce dernier auteur trouva que la méthode microscopique ne donnait des résultats supérieurs que dans le cas d'ensemencement très abondants. HEHEWERTH (224) confirma ce point de vue en 1901. La numération à la loupe subit de nombreuses modifications techniques permettant de l'employer pour l'examen de boîtes de Pétri de plus en plus riches en colonies. C'est dans ce but que furent créés plusieurs dispositifs, parmi lesquels il faut citer les appareils de WOLFHUGEL, de LINDEMANN, d'HEYROTH, de KOCH et de BRINKHAUS (265), les techniques de GRAHAM SMITH (456) et de JOHANNES ZEISZLER (523), les boîtes de SCHIMBURG, de ROZSAHIGYI, de LINDEMANN, de KAUFMANN, de LAFAR, etc...

Plus récemment, FRITZ VON GUTFELD (203) et LUSTIG (314) employèrent des feuilles à numération divisées en champs égaux. En 1931, PESCH (370) fit construire un « colonoscope » permettant la projection des colonies agrandies.

De ces deux groupes de modifications, seul le premier a donné à la technique une valeur réelle ; le second, dont le but était pour ses auteurs d'éviter la cause d'erreur apportée par la pratique de nombreuses dilutions, en a introduit de nouvelles. En effet, dans la numération de nombreuses colonies au microscope, il semble très difficile de compter celles-ci très exactement. Ces colonies sont très nombreuses et se trouvent accolées, superposées. Comme il est impossible de parcourir au microscope une plaque entière, ces auteurs se sont contentés de compter les colonies d'un certain nombre de champs et de multiplier le chiffre moyen obtenu par le nombre de champs microscopiques contenus dans la plaque.

Outre la difficulté de connaître le nombre de champs microscopiques contenus dans la plaque, il faut que l'ensemencement soit d'une *régularité absolue*. Ce résultat est impossible à atteindre étant donnée la viscosité du mélange *émulsion bactérienne-gélose fondue*. De plus, il faudrait avoir des boîtes de Pétri à fonds rigoureusement plats et à bords s'élevant à angles droits. Ces conditions sont bien difficiles à réunir.

D'autre part, au sujet de l'emploi d'ensemencements très faibles à l'aide de pipettes capillaires ou d'anses standard, nous

devons faire les mêmes objections que pour la méthode de KLEIN (c'est-à-dire variations des résultats dûes aux modifications de la tension superficielle et de la viscosité).

Est-il donc si nécessaire d'éviter les dilutions préalables à l'ensemencement? Ces dilutions constituent-elles une grande cause d'erreur? Certains auteurs ont signalé qu'il fallait éviter de diluer par trop la suspension-mère. En 1904, RUATA et CLAUDNITZ (416) trouvèrent qu'avec de fortes dilutions on obtenait un nombre de microbes plus élevé qu'avec des dilutions moins poussées. Puis, HESSE et RIEDNER (229), en 1906, signalèrent que les germes pouvaient être atteints dans leur vitalité par suite des variations apportées par les dilutions aux conditions physico-chimiques du milieu. En 1929, OTTO MUNTSCH (345), travaillant sur le bacille coli, constata également une influence du taux de dilution sur les résultats obtenus : pour cet auteur, plus la dilution était forte, plus le nombre des microbes calculés était grand. Voici ses chiffres :

78.000 avec une dilution au 1/10			
106.000	—	—	1/100
410.000	—	—	1/1.000
1.090.000	—	—	1/10.000
4.200.000	—	—	1/100.000
20.000.000	—	—	1/1.000.000
120.000.000	—	—	1/10.000.000

KROMBHOLZ (275) incrimina une inégale répartition des germes dans le liquide de suspension.

MUNTSCH, devant de tels résultats, entreprit alors une série d'expériences; il élimina tour à tour l'influence de la densité des bactéries, du temps, de la température d'incubation et du milieu nutritif. Puis, au lieu de procéder à des dilutions successives, il effectua chaque dilution directement à partir de la suspension initiale. Ce mode opératoire ne supprima pas les différences observées au cours des premiers essais. OTTO MUNTSCH pensa alors à un phénomène de concurrence vitale, se traduisant par un manque d'éléments nutritifs dans le cas des dilutions les moins grandes. Il fit des expériences en employant des quantités différentes de milieu nutritif pour la même quantité d'ensemencement. Il observa qu'il y avait un plus grand nombre de colo-

nies dans les boîtes contenant plus de milieu nutritif, mais il considéra ce fait comme un résultat préliminaire à vérifier. Il n'est donc pas arrivé à une conclusion définitive.

Remarquons toutefois que si la concentration en germes d'une suspension est d'autant plus grande que la dilution est plus forte, ce phénomène va à l'encontre de l'opinion admise par ceux qui veulent éviter toute dilution. En 1933, J. RÉGNIER et S. LAMBIN (395) reprirent les expériences de MUNTSCHE afin de voir définitivement si le fait d'effectuer des dilutions ne constituait pas une cause importante d'erreurs. C'était l'occasion de vérifier en même temps les résultats inattendus de Muntsch.

J. Régnier et S. Lambin firent une série d'expériences très complètes dans lesquelles ils recherchèrent :

1° Si la simple agitation des suspensions microbiennes suffisait à assurer une *répartition homogène* des germes, ou s'il était préférable qu'il y eût des billes de verre pour parfaire cette agitation;

2° Si l'agitation en présence de billes de verre ne risquait pas de détruire partiellement les germes. Dans ce but, ils firent des essais avec des temps d'agitation variables;

3° Si la méthode des plaques fournissait des *résultats réguliers*;

4° Si les *dilutions exerçaient vraiment une influence* sur les résultats des essais en examinant successivement :

a) l'influence de dilutions globales *semblables* mais effectuées de façon différente; b) l'influence de dilutions *variables* effectuées à partir d'une même suspension; ces essais permettant de vérifier les résultats trouvés par OTTO MUNTSCHE.

Voici ce que trouvèrent J. RÉGNIER et S. LAMBIN (396) :

1° La présence de billes de verre n'influence pas beaucoup les résultats des essais;

2° L'augmentation graduelle du temps d'agitation ne modifie pas régulièrement les résultats des essais. Il n'y a aucune raison de prendre un temps d'agitation trop prolongé. Le temps moyen de cinq minutes semble suffisant;

3° Les résultats sont d'une régularité satisfaisante. Le pourcentage d'écart avec le nombre moyen obtenu varie de 0,09 % à 29 %; dans la plupart des cas il est inférieur à 10 % (7,8 % en moyenne). Le pourcentage d'écart est même souvent identique pour deux chiffres d'un même essai;

4° a) Dans le cas de dilutions globales semblables, établies suivant un processus différent, la concentration trouvée est plus faible lorsque la dilution nécessaire pour l'obtention des plaques est faite en un seul temps, que lorsqu'elle est faite en plusieurs temps; b) dans le cas de dilutions variables effectuées à partir d'une même suspension microbienne (1/10.000, 1/20.000, 1/50.000, 1/100.000, 1/200.000, et 1/500.000), les faits constatés par OTTO MUNTSCH n'ont pas été retrouvés. Il n'y a aucune variation régulière des résultats en fonction des dilutions. La gamme des dilutions effectuées par J. Régnier et S. Lambin était plus restreinte que celle des dilutions effectuées par Otto Muntsch, mais ces auteurs se sont efforcés de n'employer qu'un mode de numération (numération à la loupe), alors que Muntsch devait calculer ses résultats tantôt sur une seule colonie, tantôt sur un si grand nombre de colonies qu'il était obligé de les dénombrer au microscope. Peut-être cette diversité dans le mode de numération est-elle la cause de ses résultats? D'ailleurs, même pour les dilutions comparables, les variations de Muntsch ne se sont pas vérifiées.

Cette méthode « des plaques » semble donc avoir une valeur certaine.

Comme J. RÉGNIER et S. LAMBIN l'ont nettement démontré, il ne faut pas craindre d'effectuer des dilutions suffisantes pour pouvoir, par des ensemencements larges, facilement mesurables, obtenir sur chaque boîte un nombre de colonies facile à dénombrer, *en totalité à la loupe*. Évidemment, il peut subsister des amas microbiens qui, après ensemencement, donneront chacun une seule colonie.

Cette difficulté de répartir également les bactéries dans toute la masse du liquide ne provient pas de la dilution seule, mais existe dès le début des manipulations, dans la culture initiale elle-même. Elle se fait d'autant mieux sentir que la dilution est faite directement dans des liquides visqueux (gélatine, gélose). Pour atténuer cette source d'erreurs, il faudra briser le plus possible ces amas microbiens par une agitation soigneuse de la culture initiale, et faire les premières dilutions, non dans des liquides visqueux, mais dans des liquides fluides (eau, eau salée, bouillon) et leur faire subir des agitations vives et prolongées. Une autre objection, quoique moins importante, est l'action nocive possible de l'eau distillée ou de l'eau physiologique sur

les microorganismes. Cette action a été signalée par divers auteurs, parmi lesquels : R. LEGROUX et G. ELIAVA (295) en 1921, DUTHOIT (127) en 1923, H. SCHMIDT (430) en 1924, SHERMAN et ALBUS (447) en 1924, WINSLOW et BROOKE (509) en 1927. Pour T. WOHLFEIL (516), les solutions les moins nuisibles sont celles de chlorhydrate d'ammoniaque, de nitrate de calcium, ou les solutions tamponnées de phosphates. Mais cette action peut être négligée ici, étant donnée la faible durée de l'opération. D'ailleurs, en 1922, WILSON (504) a montré que l'eau distillée et le sérum physiologique n'agissaient qu'après un temps assez long.

Nous considérerons donc cette méthode comme bonne; nous exposerons plus loin la technique que nous avons employée.

III. — Détermination du nombre des microbes « vivants » par examen microscopique.

1^o *Évaluation du nombre des microbes « vivants » par examen morphologique :*

HANS HECKSCHER (220) en 1921 proposa une méthode de numération basée sur l'aspect morphologique des bactéries. Voici ses propres termes : « Chaque germe, capable de proliférer, se « développe en un long bâtonnet dont la forme contraste forte-
« ment avec celle des bacilles incapables de prolifération et qui
« ne se transforment pas. A l'aide de numérations différentielles
« faites au microscope, il est donc possible de connaître quel est
« le nombre de bacillesensemencés qui proliféreront dans les
« conditions données de culture. »

Ce mode de numération semble bien difficile à réaliser pratiquement; en effet, à notre connaissance l'auteur lui-même ne donne pas de précisions sur le moment où il convient de faire l'examen. De plus, il ne semble pas avoir un point de départ tout à fait exact : « Dans un milieu liquide,ensemencé de bacilles
« appartenant à une des espèces suivantes : bacille coli, bacilles
« typhiques et paratyphiques A et B, bacille pyocyannique et
« d'autres encore, les premières heures de culture n'apportent
« aucune augmentation du nombre des microbes, mais seulement
« un changement dans leur morphologie. » H. HECKSCHER pense

donc qu'il se produit un changement de morphologie pendant la phase de latence.

Ce n'est pas l'avis de certains auteurs : tels CLARK et RUEHL (83) en 1919 et HENRICI (223 et 225). Ceux-ci observent que cet allongement ne se produit pas pendant la phase de latence, mais commence avec la phase de multiplication logarithmique, c'est-à-dire vers la 4^e heure. De plus, les formes longues ne constituent pas uniquement tous les microbes capables de se multiplier. Il peut exister des bacilles plus petits qui, venant de se diviser, seront susceptibles de se diviser à nouveau. CLARK et RUEHL ont observé que certaines bactéries : bacilles diphtériques, *Bacillus mallei*, prennent des formes très courtes pendant la phase de multiplication logarithmique et ne présentent pas de formes allongées.

2^o *Évaluation du nombre des microbes « vivants » par numération microscopique après coloration élective.*

Les microbes morts fixent énergiquement certains colorants, tandis que les bactéries vivantes ne se colorent que très faiblement. En 1923, HENRICI (224) utilisa cette propriété pour dénombrer les microbes « vivants » d'une culture. Divers auteurs : MILLER (330) et BURGESS (55) en 1920, FRASER (157) et FULMER (174) en 1921, avaient déjà utilisé cette technique pour différencier les levures vivantes des levures mortes.

HENRICI, qui étudia cette technique, estime que la fixation énergétique d'un colorant n'est pas due à la mort même des cellules, mais qu'on doit l'attribuer à un début d'autolyse. A la suite de diverses observations, cet auteur pense même que la coloration peut être attribuée à une variation de la charge électrique des cellules.

Ces méthodes, quoique très intéressantes, n'ont pas encore fait leurs preuves. D'après les auteurs eux-mêmes, elles se heurtent à des difficultés et semblent donner des résultats discutables. Aussi, pour notre part, nous avons préféré faire le dénombrement des microbes « vivants » après dilution et ensemencement de l'émulsion bactérienne sur plaques de gélose. Nous avons vu, en effet, que cette technique était bien au point et nous donnait des résultats réguliers.

IV. — Méthodes basées sur l'activité biochimique des bactéries.

Ces méthodes, peu nombreuses, sont basées sur le dosage dans le milieu de culture de produits formés ou disparus pendant la vie des microbes.

F. REGNARD (392) en 1882, BIERNACKI (39) en 1891, H. SCHULTZ (435) en 1907, SLATOR (453) en 1913, ABDERHALDEN (2) en 1915, évaluèrent l'activité des levures en mesurant la quantité de gaz carbonique produit pendant la fermentation. W. HESSE (228) en 1893 étudia la production des gaz de différents microbes à l'aide de ces méthodes. H. LUHRIG et A. SARTORI (312) en 1908, observant les variations de la déviation polarimétrique qui proviennent de la consommation du glucose, suivirent la marche de la fermentation alcoolique. D'autres auteurs, parmi lesquels NAEGELI et SCHWENDENER (347) en 1877, CHARLES RICHET (403) et ses collaborateurs : CHASSEVANT (73), H. CARDOT (403) et E. BACHRACH (15) étudièrent quantitativement la poussée des bacilles lactiques, ou l'action de divers antiseptiques sur cette poussée en titrant l'acide produit. Étudiant la multiplication du colibacille, MICHAELIS et MARCORA (324) en 1912 remplacèrent le titrage acidimétrique par des mesures de pH. Récemment, J. HOWARD MUELLER (341) en 1935 proposa une détermination quantitative de la poussée bactérienne en mesurant la quantité d'azote contenue dans le culot de centrifugation de la culture microbienne étudiée; il employa notamment cette technique pour le bacille diphtérique. Dans ce but, ilensemence ce bacille dans un milieu nutritif contenu dans des tubes à centrifuger. Après un séjour suffisant à l'étuve, les cultures sont stérilisées, puis centrifugées fortement pendant 5 minutes. Le liquide surnageant est enlevé, et le sédiment est lavé dans 0,05 % d'acide acétique. On fait alors une nouvelle centrifugation de 5 minutes, et, après un deuxième lavage, on détermine la quantité d'azote contenue dans le culot microbien en employant la méthode du micro-Kjeldahl (PREGL, 1930). Il est ainsi démontré que la quantité d'azote monte environ jusqu'à 40 heures, se maintient ensuite jusqu'à 66 heures, pour redescendre finalement. J. HOWARD MUELLER préfère cette méthode parce qu'il trouve l'évaluation directe du nombre de microbes trop incertaine et

trop subjective, et la technique permettant l'estimation du poids sec, trop complexe.

Il existe encore d'autres techniques biochimiques utilisées dans la bactériologie du sol (ammonification, nitrification, fixation d'azote). Mais ces méthodes ne peuvent s'appliquer qu'à un petit nombre de microbes. Ce ne sont pas des méthodes générales et on ne peut les appliquer à la plupart des microbes habituels.

Étant donnée l'imperfection de nos connaissances actuelles sur la biochimie bactérienne, il semble difficile d'établir une proportion exacte entre le nombre des éléments microbiens et les changements de composition du milieu. R. DAVID (104) a vérifié que les diastases provoquant les modifications chimiques continuent à agir après la mort des cellules qui les ont formées. Ceci est très important et nous montre que « les modifications chimiques ne sont pas forcément parallèles au développement microbien ». (R. DAVID).

CHAPITRE DEUXIÈME

MÉTHODES DE NUMÉRATION DES MICROBES UTILISÉS DANS NOS ESSAIS

Nous allons exposer maintenant les méthodes de numération microbienne, que nous avons employées et dire pourquoi nous les avons choisies. Comme nos expériences s'annonçaient longues et comportaient de fréquents dénombrements, nous avons été séduit par la méthode directe du compte-microbes, qui présente des manipulations simples et rapides. Afin de l'utiliser dans nos essais, nous avons voulu préalablement la comparer avec une méthode ayant fait ses preuves : la méthode comparative de WRIGHT-FRIES. Dans ce but, nous avons fait des numérations microbiennes simultanément à l'aide de la méthode de Wright-Fries et d'une cellule compte-microbes. Nous indiquerons pour quelles raisons nous n'avons pas employé dans nos expériences cette technique du compte-microbes. Exposons d'abord le mode opératoire utilisé pour chacune de ces techniques.

I. — Technique de la numération microscopique comparative (selon la méthode de Wright-Fries) de la totalité des éléments microbiens.

1^o Préparation des suspensions microbiennes :

Ces émulsions bactériennes sont préparées à partir de cultures sur gélose ayant séjourné à l'étuve à 37°, pendant 24 heures. Dans ce but, à l'aide d'une anse de platine, on racle très légèrement et avec précaution la surface de la culture afin d'avoir un prélèvement microbien ne comportant aucun fragment de gélose. La masse microbienne ainsi prélevée est alors très soigneusement émulsionnée dans de l'eau distillée stérile. L'homogénéisation de la suspension est obtenue par une vive agitation en présence de billes de verre. Cela est indispensable pour briser les amas

microbiens dont la présence constituerait d'importantes causes d'erreur.

2^o *Numération des germes de la suspension microbienne :*

J. RÉGNIER et S. LAMBIN (393) étudièrent tout particulièrement la mise au point de cette technique. Ils utilisèrent d'abord la technique de Wright modifiée par ALLEN (7) : Prélèvement de sang à la veine marginale de l'oreille de lapin, mélange de 0 cm³ 5 de ce sang à 0 cm³ 5 de solution de citrate de soude à 1,5 %, addition de 0 cm³ 5 d'émulsion microbienne pure ou diluée, mélange soigneux, étalement à l'anse de platine sur des lames bien dégraissées, séchage rapide par agitation à l'air, coloration par la méthode de TRIBONDEAU, telle était cette technique.

J. Régnier et S. Lambin rencontrèrent cependant de grandes difficultés, pour prélever des quantités suffisamment abondantes de sang, et pour éviter les risques de coagulation pendant ou après le prélèvement, l'hémolyse et les précipitations venant du colorant.

Cette technique enfin était longue : un quart d'heure pour le prélèvement, cinq minutes pour l'étalement et la dessiccation, vingt-cinq minutes pour la coloration, ce qui fait trois quarts d'heure utilisés seulement pour la préparation des lames. C'est pourquoi J. Régnier et S. Lambin employèrent la modification indiquée par FRIES (160) : *remplacement des hématies par des cellules de levure*, faciles à obtenir, à conserver et à colorer. Plus tard, sur leurs conseils, nous remplaçâmes la coloration au Tribondeau par une solution hydro-alcoolique de fuchsine. Celle-ci mise en contact 5 minutes seulement avec la préparation colore intensément levures et microbes. Ces deux modifications permirent de réaliser une grosse économie de temps dans l'emploi de cette technique.

La numération des germes peut se subdiviser en trois parties :

a) Préparation et titrage de l'émulsion de levures; b) préparation et coloration du mélange levures-bactéries; c) numération proprement dite des éléments et calcul des résultats.

a) *Préparation et titrage de l'émulsion de levures :*

On prend un gramme de levure de boulanger bien fraîche, que l'on délaye soigneusement dans un mortier de verre avec quelques gouttes d'eau distillée stérile. On obtient une pâte lisse

et bien homogène. A cette pâte, on ajoute, par portions de 5 cm³, soixante centimètres cubes d'eau distillée stérile. La partie sur-nageante est décantée après chaque addition, elle est versée dans une fiole d'Erlenmeyer contenant des billes de verre et stérilisée. On conserve cette émulsion en y ajoutant 1 cm³ de chloroforme et en la plaçant à la glacière.

Pour titrer cette émulsion de levures, on emploie l'hématimètre de Malassez. On l'agite d'abord vigoureusement, puis à l'aide d'une pipette stérile on en prélève 1 cm³, que l'on dilue avec 50 cm³ d'eau distillée dans une fiole jaugée et garnie de billes de verre. On agite soigneusement la dilution. On dépose alors une goutte de cette dernière émulsion dans la cellule de Malassez, on laisse sédimenter un temps suffisant (quinze minutes), puis on compte les cellules se trouvant dans 6 ou 7 rectangles pris au hasard dans le quadrillage de l'hématimètre. Ces rectangles sont eux-mêmes divisés en 20 petits carrés : étant donné que chaque rectangle correspond à un volume de 1/100 de millimètre cube, il suffira de multiplier par 100.000 et par 50 la moyenne des nombres de levures trouvés dans chaque rectangle pour avoir le nombre de cellules contenues dans un centimètre cube de la *suspension-mère*. (Pour plus de certitude, on fait deux numérations successives à quelques heures d'intervalle. Le résultat définitif sera formé par la moyenne des deux valeurs ainsi obtenues).

Nous avons le plus souvent employé des suspensions de levures contenant 200 à 250 millions de cellules par centimètre cube. Il est nécessaire de les renouveler tous les cinq ou six jours : en effet, au bout de ce temps, les cellules présentent quelque difficulté à se colorer.

b) *Préparation et coloration du mélange levures-bactéries :*

On introduit dans un tube à essais stérile en verre pyrex et contenant quelques billes de verre, une quantité connue d'émulsion de levure (1 ou 2 cm³) et une quantité également connue d'émulsion bactérienne à tirer. On agite vivement ce mélange. Très rapidement, afin d'empêcher la sédimentation de s'effectuer, on prélève une goutte du mélange, à l'aide d'une pipette Pasteur stérile. Cette goutte est déposée sur une lame parfaitement propre et rigoureusement dégraissée, elle est étalée rapidement en déplaçant dans des sens variés l'extrémité de la pipette Pas-

teur fermée à son extrémité. On prépare ainsi quatre lames. On laisse sécher à l'air sans chauffer; on fixe à l'alcool-éther et on colore par contact de cinq minutes avec une solution hydro-alcoolique de fuchsine. Cela fait, on lave très soigneusement à l'eau distillée, en laissant couler *très doucement* l'eau sur l'extrémité supérieure de la lame maintenue légèrement inclinée.

Sur ces préparations, les cellules de levures se différencient facilement des bactéries. Les deux sortes d'éléments doivent être sensiblement en proportions identiques dans chaque champ. Avec un peu d'habitude, on trouve facilement les quantités des deux suspensions qu'il convient de mélanger pour se placer dans les meilleures conditions d'observation.

c) *Numération des éléments et calcul des résultats :*

On compte le nombre de cellules de levures et le nombre de bactéries contenues en même temps dans quinze ou vingt champs, *pris au hasard* sur la préparation. On répète ce processus sur les trois meilleures lames préparées. La moyenne des trois nombres obtenus est prise comme résultat.

L'exemple suivant montre que les résultats sont assez réguliers :

PREMIÈRE LAME		DEUXIÈME LAME		TROISIÈME LAME	
Cellules de levure	Bacilles pyocyaniques	Cellules de levure	Bacilles pyocyaniques	Cellules de levure	Bacilles pyocyaniques
11	23	14	42	6	17
19	34	13	15	10	32
25	55	11	18	15	28
18	47	9	22	12	22
10	36	8	43	19	37
14	65	10	21	12	25
24	38	19	28	13	40
36	74	16	53	9	21
20	68	12	24	11	29
12	36	14	45	25	48
7	21	10	28	17	24
10	17	16	8	21	40
12	20	5	16	9	12
22	25	9	11	24	35
8	15	6	5	12	23
248	574	172	379	215	433

Cette numération donne donc, au total $(248 + 172 + 215) = 635$ levures pour $(574 + 379 + 433) = 1.386$ bactéries.

La suspension de levures utilisées pour cette numération contenant 231 millions de cellules par centimètre-cube, et le mélange ayant été fait avec 2 cm³ de suspension de levures et 0 cm³ 2 de suspension bactérienne, le nombre X de bacilles pyocyaniques par centimètre-cube d'émulsion microbienne est donné par la formule :

$$X = \frac{2}{0,2} \times \frac{1.386}{635} \times 231$$

ce qui fait 5.042 millions de bacilles pyocyaniques par centimètre cube d'émulsion.

D'une façon générale : X étant le titre de l'émulsion microbienne, en millions par centimètre-cube, — k étant le titre de la suspension de levure, en millions par centimètre-cube, on a :

$$X = \frac{\text{volume de levures}}{\text{volume de bactéries}} \times \frac{\text{somme des bactéries comptées}}{\text{somme des levures comptées}} \times k$$

II. — Technique de la numération microscopique directe à l'aide de cellules « compte-microbes ».

A) Description des cellules compte-microbes expérimentées.

Nous avons expérimenté trois modèles de cellules compte-microbes :

1^o Un compte-microbes fourni par la maison Jouan, qui, nous l'avons appris ultérieurement, était construit sur les données de SALIMBENI.

2^o Un compte-microbes fourni par la maison Cogit sous le nom de « CELLULE SALIMBENI-PETIT ».

3^o Un compte-microbes fourni par la maison Reichert de Vienne et construit sur les données de STEINER (466).

Les deux premiers modèles sont identiques, tant par l'aspect extérieur que par leur réseau micrométrique. Nous en donnons ci-dessous un schéma de face et en coupe. En voici la description :

Une plaque de verre recouverte ou non de métal, comporte au centre un espace circulaire en verre. Cet espace est entouré

d'une partie légèrement évidée et possède un réseau gravé sur sa partie centrale. Immédiatement autour de la partie évidée se trouvent trois petites vis d'appui légèrement surélevées de telle sorte qu'une lamelle y étant posée délimite un espace de profondeur bien déterminée (0 mm. 02) au-dessus du réseau gravé. Le réseau est constitué par 20×20 carrés ayant chacun 0,05 mm. de côté. De cinq carrés en cinq carrés, dans le sens longitudinal et dans le sens transversal, ceux-ci sont séparés en deux par une ligne intermédiaire. Ces doubles lignes délimitent donc sur la totalité du réseau 16 secteurs qui facilitent la numération.

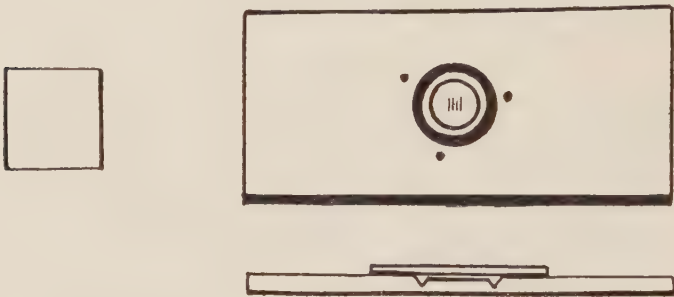


Fig. 1. — CELLULE COMPTE-MICROBES DE SALIMBENI,

Chaque petit carré du réseau ayant 0 mm. 05 de côté, sa surface est de 0 mm² 0025 (1/400 de millimètre-carré). La profondeur de la cellule étant de 0 mm. 02 (1/50 de millimètre) chaque petit carré du réseau aura donc un volume de $0,02 \times 0,0025 = 0,00050$ (1/20.000 de millimètre-cube). La quantité de microbes contenue dans un millimètre-cube de suspension microbienne s'obtiendra en multipliant par 20.000 le nombre moyen de germes contenus dans un petit carré.

L'appareil de STEINER (466) est complètement en verre. La surface graduée est au centre de la lame, mais les parties évidées sont disposées de façon transversale par rapport à la plus grande longueur de la lame, et non plus au centre sous forme circulaire. La cellule délimitée à sa partie supérieure par la lamelle a une profondeur qui atteint seulement la moitié de la cellule Salimbeni, c'est-à-dire 0 mm. 01. On emploie ici non une lamelle ordinaire, mais une lamelle spéciale, mince, maintenue rigide

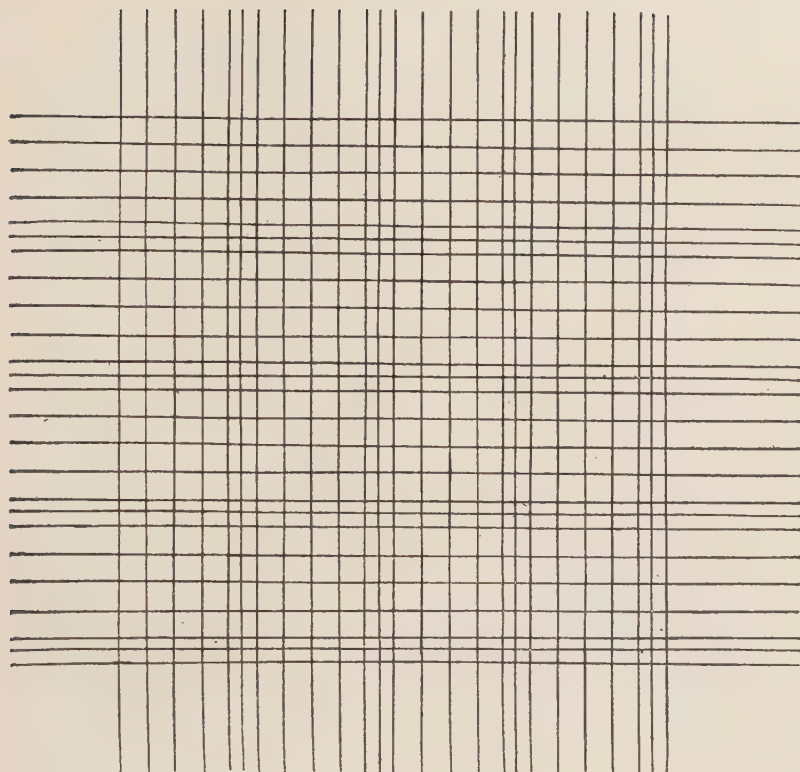


Fig. 2. — RÉSEAU DES CELLULES COMPTE-MICROBES.

par un anneau de verre creux, qui a l'avantage de l'alourdir en même temps. Voici un schéma de ce compte-microbes, vu de face et en coupe :

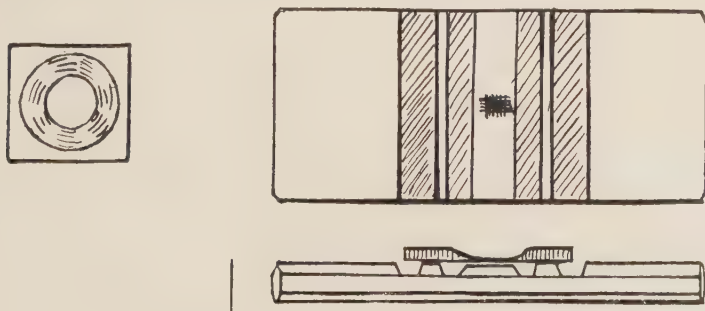


Fig. 3. — CELLULE COMPTE-MICROBES DE STEINER.

Le réseau micrométrique est le même que celui que nous avons décrit ci-dessus. Chaque petit carré a une surface de $0,5 \times 0,05 = 0 \text{ mm}^2 \text{ } 0025$, la profondeur étant ici seulement de $0 \text{ mm. } 01$, le volume correspondant est $0,0025 \times 0,01 = 0 \text{ mm}^3 \text{ } 000025$, soit $1/40.000$ de millimètre-cube. Avec ce compte-microbes, il faudra donc multiplier par 40.000 le nombre moyen de germes contenus dans un petit carré, pour avoir le nombre de germes par millimètre-cube.

B) Technique utilisée dans l'emploi de ces cellules compte-microbes.

L'émulsion microbienne est préparée comme il a été dit au sujet de la méthode de Wright-Fries. Elle est bien agitée et on en introduit un centimètre cube dans un tube à essais en verre Pyrex contenant des billes de verre et 9 cm^3 d'une solution colorante. Il est, en effet, préférable de colorer les microbes pour en faciliter la visibilité et procéder à leur numération. On agite donc ce mélange très soigneusement pendant cinq minutes, puis on le laisse au repos dix minutes afin d'obtenir une bonne coloration. Après une nouvelle agitation, on prélève, à l'aide d'une pipette rigoureusement propre et sèche, une goutte du mélange, que l'on dépose sur la lamè de la cellule compte-microbes, préalablement disposée sur la platine du microscope. On place la lamelle bien propre en évitant l'apparition de bulles d'air. La goutte ainsi prélevée ne doit pas être trop grosse afin d'éviter toute mobilité de la lamelle. On laisse la sédimentation se faire pendant quinze minutes. On procède alors à la numération au moyen d'un fort objectif à sec (n° 8 Stiasnie) d'un certain nombre de carrés du réseau. (Nous avons toujours examiné pour chaque essai 50 de ces carrés pris au hasard).

d étant la dilution à laquelle la suspension a été soumise (y compris celle apportée par le colorant), n étant le nombre moyen de germes contenus dans un petit carré du réseau, le nombre de germes x contenus dans 1 cm^3 de la suspension microbienne à titrer sera donné par la formule :

$$x = n \times d \times 20.000 \times 1.000$$

dans le cas de la cellule de SALIMBENI, et

$$x = n \times d \times 40.000 \times 1.000$$

dans le cas de la cellule de STEINER.

Nous avons expérimenté des suspensions contenant de 100 millions à 15 milliards de germes par centimètre-cube et opéré avec différents microbes : bacille pyocyanique, bacille coli, bacille subtilis et staphylocoque.

C) *Expériences personnelles :*

1° Choix du colorant. Comparaison de la technique microscopique du « compte-microbes » avec la méthode microscopique comparative de WRIGHT-FRIES.

Dans la numération des bactéries au moyen de la cellule compte-microbes, on se heurte à deux difficultés principales : 1° on risque, du fait des mouvements des bactéries (mouvements propres et mouvements browniens), de compter plusieurs fois les mêmes éléments; 2° si l'on examine les germes sans les colorer préalablement, on laisse certainement passer inaperçus un nombre inconnu de germes. Les auteurs ont donc naturellement cherché à la fois à colorer les bactéries et à les immobiliser. A cet effet, ils ont proposé l'emploi de différentes solutions : SCOTT et SCOTT (438) mélangeaient des parties égales de l'émulsion bactérienne et de la solution suivante : solution de GIEMSA : 5 cm³; chlorure de sodium : 0 gr. 10; formaline : 4 cm³; eau distillée q. s. pour 100 cm³.

CALLISON (60) diluait l'émulsion bactérienne dans la proportion de 1/100, avec la solution suivante : bichlorure de mercure à 2 % : 100 cm³; acide chlorydrique : 1 cm³; solution aqueuse de fuchsine acide à 1 % : 100 cm³.

WOHLFEIL (516) utilisait, lui aussi, comme agent fixateur, le sublimé à la dose de 0,1 % dans une solution de chlorure de sodium.

STEINER (466), avant d'arriver au choix de la solution hydroalcoolique de bleu de méthylène phéniqué (bleu de KUHNE), faisait agir des vapeurs d'éther sur les suspensions bactériennes,

ce qui arrêta rapidement la mobilité des germes, qu'il ne restait plus qu'à colorer.

En ce qui nous concerne, nous avons dû procéder à des expériences préalables. Nous avons tour à tour étudié l'action :

1° *De la thionine phéniquée* (thionine : 0 gr. 50; alcool absolu : 10 cm³; acide phénique cristallisé : 10 gr.; eau distillée : 90 cm³).

2° *De la fuchsine phéniquée formolée* (fuchsine : 0 gr. 10; acide phénique cristallisé : 0 gr. 50; alcool à 95° : 1 cm³; eau distillée : 99 cm³). Au moment de l'essai, on ajoutait à 10 cm³ de l'émulsion microbienne 1/2 cm³ de la solution de fuchsine phéniquée et 1 cm³ de solution de formol.

3° *De la solution hydro-alcoolique de fuchsine* (fuchsine : 0 gr. 10; alcool à 95° : 1 cm³; eau distillée : 99 cm³).

4° *Du bleu phéniqué de Kühne* (bleu de méthylène : 1 gr. 5; acide phénique liquide : 0 gr. 05; alcool à 96° : 10 cm³; eau distillée 95 cm³). STEINER l'employait dans la proportion d'une partie pour quatre parties d'émulsion bactérienne. Les essais entrepris avec cette solution colorante ne furent pas poursuivis, une forte agglutination des germes ayant été constatée dès le début des essais.

5° *De la solution mise au point par HORWATH* (240) en 1930 et destinée spécialement à faciliter les numérations au compte-microbes. Cet auteur eut l'idée d'arrêter les mouvements des microbes, non par l'emploi de substances fixatrices, mais par l'utilisation d'un liquide ayant une forte viscosité, incapable pourtant, de produire des modifications osmotiques des corps bactériens ou de permettre la multiplication des germes. Il préconisa finalement l'emploi d'une solution *glycérinée* à laquelle il ajouta une certaine quantité de violet de gentiane. La composition de ce liquide est la suivante :

Solution de violet de gentiane à 10 % dans	
l'alcool à 95°.....	10 gouttes.
Glycérine	30 cm ³
Alcool à 95°	10 cm ³
Eau distillée.....	60 cm ³

Nous avons utilisé ce liquide dans la proportion de 9 cm³ pour 1 cm³ d'émulsion microbienne.

a) APPRÉCIATION DES RÉSULTATS.

Dans l'impossibilité qu'il y a de connaître le *nombre exact* de germes contenus dans les émulsions microbiennes, le mieux est de se baser sur des valeurs moyennes et de comparer le chiffre moyen obtenu par l'emploi de la méthode de WRIGHT-FRIES avec le chiffre moyen obtenu en utilisant la méthode de la cellule compte-microbes sur la même émulsion microbienne. Cela constituera une sorte d'épreuve d'exactitude, mais toute relative. Nous pourrons avoir, d'autre part, une véritable épreuve de régularité de chaque technique en déterminant l'écart entre les valeurs obtenues au cours de deux numérations successives effectuées selon cette même technique. Afin de faciliter l'interprétation des résultats, ces diverses comparaisons ont été établies au pourcentage. Nous mentionnerons dans les tableaux suivants :

1^o l'écart pour 100 entre les résultats fournis, d'une part, par la cellule compte-microbes utilisée et d'autre part, par la technique de Wright-Fries, les résultats donnés par cette dernière étant considérés égaux à 100.

2^o l'écart pour 100 entre les valeurs obtenues au cours de deux numérations successives selon une même technique, le chiffre le plus élevé ayant été fait égal à 100.

b) EXPOSÉ DE NOS RÉSULTATS.

Nous donnons d'abord les résultats des expériences faites dans le but de choisir le colorant, qui convient le mieux, pour effectuer la meilleure numération directe à la cellule compte-microbes. Dans cette série d'essais, nous avons expérimenté des colorants différents et des espèces microbiennes différentes. Rappelons que, pour la technique de Wright-Fries nous avons toujours utilisé la solution hydro-alcoolique de fuchsine, telle qu'elle a été décrite précédemment.

Dans le tableau I sont groupés les résultats des essais effec-

tués avec la thionine phéniquée et dans le tableau 2, ceux effectués avec la fuchsine phéniquée et formolée.

Tableau I. — BACTÉRIE EN EXPÉRIENCE : *B. pyocyannique*.

Essai Nos	A Valeurs obtenues par numération directe (compte-microbes <i>Salimbeni-Jouan</i>) (coloration à la thionine phéniquée)	Pour- centage des écarts entre. <i>a</i> et <i>b</i>	B Valeurs obtenues par numération indirecte (technique de <i>Wright-Fries</i>) colora- tion à la fuchsine simple)	Rapport des nombres $\frac{A}{B}$ $B = 100$ (nombre moyen s'il y a lieu)
1	a) 2.440.000.000 b) 2.960.000.000	17	3.766.000.000	71 / 100
2	a) 1.080.000.000 b) 840.000.000	22	1.856.000.000	51 / 100
3	400.000.000		690.000.000	57 / 100
4	400.000.000		708.000.000	56 / 100

L'examen des valeurs contenues dans ces tableaux nous permet de constater les faits suivants :

1° En utilisant comme colorant, pour les numérations directes au compte-microbes, la *thionine phéniquée*, on obtient des valeurs relativement faibles par rapport à celles que fournit la technique de WRIGHT-FRIES. Ceci nous conduit à supposer que de nombreux microbes sont insuffisamment colorés par la thionine et passent, de ce fait, inaperçus à la numération. Le contact de l'émulsion microbienne ne pouvant, évidemment, pas être prolongé au delà d'une certaine limite de temps, il convient de rejeter ce colorant.

2° Lorsqu'on utilise la *fuchsine phéniquée formolée*, on obtient le plus souvent, au contraire, des résultats supérieurs à ceux que fournit la technique de Wright-Fries. Ceci provient, très vraisemblablement, du fait que le formol entraîne la coagulation de

Tableau II. — BACTÉRIES EN EXPÉRIENCE :
Colibacille, Staphylocoque, Bacillus subtilis.

Germe en expérience	Essai N°	A	Pourcentage d'écart entre <i>a</i> et <i>b</i>	B	Rapport des nombres $\frac{A}{B}$ $B \times 100$ (nombre moyen s'il y a lieu)
		Valeurs obtenues par numération directe (compte-microbes Salimbeni Jouan) (coloration à la fuchsine phéniquée formolée)		Valeurs obtenues par numération indirecte (technique de Wright-Fries)	
Colibacille	5	a) 5.493.000.000 b) 4.120.000.000	24	4.248.000.000	113/100
	6	a) 1.600.000.000 b) 2.000.000.000	20	1.707.000.000	101/100
	7	a) 2.400.000.000 b) 1.600.000.000	33	1.848.000.000	108/100
	8	a) 2.840.000.000 b) 2.200.000.000	23	2.310.000.000	109/100
	9	a) 1.720.000.000 b) 1.880.000.000	8	2.344.000.000	78/100
Staphylocoque	10	a) 3.140.000.000 b) 3.040.000.000	3	1.180.000.000	261/100
	11	a) 9.200.000.000 b) 6.400.000.000	30	4.248.000.000	183/100
B. subtilis	12	a) 760.000.000 b) 600.000.000	21	785.400.000	86/100
	13	3.200.000.000		3.250.000.000	98/100

substances albuminoïdes, et produit ainsi des précipités qui sont confondus avec les germes lors des numérations. L'emploi de la fuchsine phéniquée formolée, et, en général, de colorants addi-

tionnés de fixateurs, semble donc également devoir être rejeté, bien que le formol puisse présenter l'avantage, dans certains

Tableau III
COMPTE-MICROBES DE STEINER (REICHERT)

Germe en expérience	Essai Nos	A Valeurs obtenues par numération directe (compte-microbes <i>Salimbeni - Jouan</i>) (coloration à la fuchsine)	Pour-cent : d'écart entre <i>a</i> et <i>b</i>	B Valeurs obtenues par numération indirecte (technique de <i>Wright-Fries</i>)	Pour-cent : d'écart entre <i>a</i> et <i>b</i>	Rapport des nombres $\frac{A}{B}$ B = 100 (nombre moyen s'il y a lieu)
B. Pyocyanique	14	a) 90.000.000 b) 110.000.000	18	141.600.000		70/100
	15	a) 1.480.000.000 b) 1.580.000.000	6	a) 1.478.000.000 b) 1.423.000.000	3	105/100
	16	a) 1.120.000.000 b) 1.320.000.000	15	a) 1.399.000.000 b) 1.145.000.000	14	98/100
	17	a) 1.960.000.000 b) 1.320.000.000	32	a) 1.665.000.000 b) 1.570.000.000	5	101/100
	18	a) 10.400.000.000 b) 11.200.000.000	7	a) 14.018.400.000 b) 14.496.300.000	3	78/100
Sta- phylo- coque	19	a) 1.880.000.000 b) 1.760.000.000	5	a) 1.768.000.000 b) 1.972.000.000	10	97/100
B. subtilis	20	a) 2.040.000.000 b) 2.120.000.000	3	2.079.000.000		100/100
	21	a) 800.000.000 b) 840.000.000	5	831.000.000		98/100
	22	a) 960.000.000 b) 1.040.000.000	7	1.002.000.000		94/100

cas, d'arrêter plus rapidement la mobilité des germes. A la suite de ces constatations, nous avons entrepris une série d'essais en utilisant comme solution colorante, aussi bien pour la numération au compte-microbes que pour la technique de Wright-Fries une simple solution hydroalcoolique de fuchsine. Ces essais ont été effectués d'abord avec les compte-microbes Salimbeni (Jouan), ensuite avec le compte-microbes Steiner (Reichert). Les résultats obtenus sont réunis dans les tableaux III et IV.

Dans le tableau III, nous donnons les résultats obtenus, en comparant la technique de WRIGHT-FRIES à celle du compte-microbes de SALIMBENI.

Tableau IV

Germe en expérience	Essai Nos	A Valeurs obtenues par numération directe (compte-micro bes <i>Steiner</i>) (coloration à la fuchsine simple)	Pourcentage d'écart entre <i>a</i> et <i>b</i>	B Valeurs obtenues par numération indirecte (technique de <i>Wright-Fries</i>)	Rapport des nombres $\frac{A}{B}$ B = 100 (nombre moyen s'il y a lieu)
Colibacille	23	a) 1.600.000.000 b) 1.720.000.000	6	2.150.000.000	77 /100
	24	a) 2.240.000.000 b) 2.880.000.000	22	3.010.000.000	85 /100
	25	a) 1.600.000.000 b) 1.440.000.000	10	1.990.000.000	76 /100
Staphylocoque	26	a) 4.700.000.000 b) 5.230.000.000	10	3.470.000.000	143 /100
	27	a) 7.120.000.000 b) 5.680.000.000	20	4.406.000.000	147 /100
	28	a) 7.830.000.000 b) 7.240.000.000	7	6.060.000.000	124 /100

Dans le tableau IV, nous présentons les résultats d'expériences identiques, mais effectuées cette fois en utilisant le compte-microbes de STEINER.

Dans les deux tableaux suivants, nous présentons les résultats des expériences effectuées avec le liquide de HORWATH (240).

Tableau V

Germe en expérience	Essai Nos	A Valeurs obtenues par numération directe (compte-microbes <i>Salimbeni-Jouan</i>) (emploi du liquide de <i>Horwath</i>)	Pour-cent : d'écart entre <i>a</i> et <i>b</i>	B Valeurs obtenues par numération indirecte (technique de <i>Wright-Fries</i>)	Pour-cent : d'écart entre <i>a</i> et <i>b</i>	Rapport des nombres $\frac{A}{\bar{B}}$ $B = 100$ (nombre moyen s'il y a lieu)
B. Pyocyanique	29	a) 4.080.000.000 b) 4.240.000.000	3			
	30	a) 3.640.000.000 a) 4.080.000.000	10			
	31	a) 3.200.000.000 b) 3.320.000.000 c) 4.480.000.000	3 28			
	32	a) 2.250.000.000 b) 3.250.000.000	30	a) 3.024.500.000 b) 3.287.000.000	8	98/100
	33	a) 2.480.000.000 b) 2.560.000.000	3	a) 1.972.500.000 b) 1.841.000.000	6	125/100
	34	a) 3.920.000.000 b) 3.720.000.000	5	a) 3.787.200.000 b) 3.813.500.000	0,7	98/100

Dans le tableau V, nous exposons les résultats obtenus, en comparant la technique de WRIGHT-FRIES à celle du compte-microbes SALIMBENI et dans le tableau VI, les résultats d'expériences identiques, mais effectuées avec le compte-microbes de STEINER.

Tableau VI

Germe en expé- rience	Essai Nos	A Valeurs obtenues par numération directe (compte-microbes <i>Steiner-Reichert</i>) (emploi du liquide de <i>Horwath</i>)	Pour- centage d'écart entre <i>a</i> et <i>b</i>	B Valeurs obtenues par numération indirecte (technique de <i>Wright-Fries</i>)	Rapport des nombres $\frac{A}{\bar{B}}$ $B = 100$ (nombre moyen s'il y a lieu)
Colibacille	35	a) 4.160.000.000 b) 3.200.000.000	23	3.750.000.000	82/100
	36	a) 2.256.000.000 b) 2.800.000.000	19	3.010.000.000	83/100
	37	a) 1.688.000.000 b) 2.550.000.000	33	3.190.000.000	119/100
	38	a) 4.800.000.000 b) 6.960.000.000	31	4.540.000.000	129/100
	39	a) 4.080.000.000 b) 3.760.000.000	7	4.815.000.000	81/100
	40	a) 1.920.000.000 b) 2.448.000.000	22	2.500.000.000	87/100
Staphylocoque	41	a) 3.660.000.000 b) 2.900.000.000	20	2.690.000.000	120/100
	42	a) 4.720.000.000 b) 6.480.000.000	27	3.730.000.000	150/100
	43	a) 4.000.000.000 b) 5.400.000.000	25	3.470.000.000	135/100
	44	a) 4.680.000.000 b) 3.500.000.000	25	3.440.000.000	118/100
	45	a) 5.200.000.000 b) 7.280.000.000	28	4.406.000.000	141/100
	46	a) 7.840.000.000 b) 6.080.000.000	22	6.060.000.000	114/100

Le tableau VII, que nous donnons maintenant, contient les résultats des essais effectués pour apprécier, d'une manière plus approfondie, la régularité de la méthode de WRIGHT-FRIES.

Tableau VII

Germe en expérience	Essai N ^{os}	Valeurs obtenues au cours de deux numérations successives d'une même émulsion selon la technique <i>Wright-Fries</i>	Pourcentage d'écart entre <i>a</i> et <i>b</i>
Colibacille	47	<i>a</i>) 2.327.250.000 <i>b</i>) 2.022.750.000	12
	48	<i>a</i>) 2.465.000.000 <i>b</i>) 2.175.000.000	11
	49	<i>a</i>) 1.058.500.000 <i>b</i>) 1.036.750.000	2
	50	<i>a</i>) 942.500.000 <i>b</i>) 870.000.000	7
	51	<i>a</i>) 864.000.000 <i>b</i>) 870.000.000	7
Staphylocoque	52	<i>a</i>) 2.713.000.000 <i>b</i>) 3.055.000.000	11
	53	<i>a</i>) 1.750.000.000 <i>b</i>) 1.462.000.000	16
	54	<i>a</i>) 4.137.900.000 <i>b</i>) 4.056.000.000	1,9

2^o Discussion de nos résultats et conclusions.

Voici ce que nous pouvons déduire de ces tableaux :

1^o En ce qui concerne les essais de régularité, nous trouvons :

a) Coloration à la fuchsine simple :

	Écart maximum pour 100	Écart moyen pour 100	Écart minimum pour 100
Technique de WRIGHT-FRIES...	16	7,9	1,9
Technique du compte-microbes SALIMBENI.....	32	10	3
Technique du compte-microbes de STEINER.....	22	12,5	6

b) Coloration au liquide Horwath :

Technique du compte-microbes de SALIMBENI.....	30	11	3
Technique du compte-microbes de STEINER.....	33	23	7

Les auteurs américains : GLYNN,
POWELL, REES et COX (189)
ont obtenu :

Technique de WRIGHT-ALLEN...	54	15	1,1
Technique du compte-microbes.	21	5	0,5

Contrairement à eux, nous trouvons une légère supériorité en faveur de la technique de Wright-Fries. Peut-être cette différence provient-elle du fait que la modification de Fries nous paraît être supérieure à celle d'Allen, et surtout du fait que *l'expérience acquise* joue un rôle très important dans l'utilisation de ces techniques. Nous avons une bien plus grande expérience de la méthode de WRIGHT-FRIES employée depuis plusieurs années que de celle du compte-microbes utilisée depuis plusieurs mois seulement.

2° En ce qui concerne *l'espèce bactérienne ou plutôt la forme des microbes* : a) Les résultats sont très voisins pour les gros bacilles prenant fortement le colorant, tel le *Bacillus subtilis* (rapport minimum 94 %). — b) Lorsqu'il s'agit de bacilles plus grêles, donc plus difficiles à distinguer, comme le *bacille coli*, le *bacille pyocyannique*, les valeurs trouvées présentent déjà des différences plus grandes (rapport minimum : 70 % pour le bacille

pyocyannique, 76 % pour le colibacille). Dans ces deux cas les nombres trouvés par le procédé de Wright-Fries sont toujours les plus grands. c) Au contraire, pour des cocci (*staphylocoque*) nous obtenons des valeurs plus grandes avec le compte-microbes qu'avec la méthode Wright-Fries (rapport maximum 147 % avec la fuchsine simple et 150 % avec le liquide de Horwath).

Nous ne pouvons expliquer ce fait qu'en admettant que certains précipités, dépôts de matière colorante, etc., peuvent être dénombrés, au compte-microbes, au même titre que des cocci. PRAUSNITZ (379) a d'ailleurs également signalé qu'il était possible de faire au compte-microbes des confusions entre les cocci et les particules colloïdales du liquide. Cette supposition permet d'attribuer encore une certaine supériorité à la méthode de Wright. En effet, il est plus facile de bien voir tous les microbes et de les distinguer des éléments étrangers lorsque ces microbes sont fixés, bien colorés, et observés à un grossissement relativement fort (méthode de Wright-Fries) que lorsqu'ils sont faiblement colorés, encore mobiles, placés parfois à des niveaux différents et observés à un grossissement relativement faible (compte-microbes).

3° En comparant *les comptes-microbes employés*, malgré les progrès techniques évidents que présente le compte-microbes de Steiner, nous n'avons pas trouvé pour cet appareil de résultats nettement supérieurs à ceux donnés par l'autre cellule. Malgré l'avantage de la faible profondeur de la cellule, il faut envisager que toute erreur faite à la numération est multipliée par un chiffre deux fois plus grand que pour l'autre appareil.

Par ailleurs, les essais de *régularité*, présentés par STEINER, cadrent parfaitement avec nos résultats.

4° En ce qui concerne *le choix du colorant*, dans le cas où nous nous sommes placé (émulsion de bactéries en eau distillée), nous pensons qu'il vaut mieux rejeter toute addition à la solution colorante de substances fixatrices (formol) et de substances antiseptiques (phénol), ces substances pouvant provoquer l'agglutination des bactéries ou la précipitation des substances albuminoïdes. Il faut, de plus, faire en sorte que seules les bactéries soient nettement colorées, sans que le liquide de suspension soit trop teinté ou que se produisent des dépôts de matières colorante.

Quoique Steiner ait préféré le bleu phéniqué de Kühne, nous trouvons supérieur l'emploi de la solution hydro-alcoolique de fuchsine. Cette différence vient peut-être de ce que Steiner travaillait directement sur des bouillons de culture, alors que nous-même avons opéré sur des émulsions en eau distillée. Lorsqu'on compare les résultats obtenus en employant d'une part la solution hydro-alcoolique de fuchsine et d'autre part le liquide de Horwath, il ne nous est pas possible d'affirmer que les résultats obtenus avec ce dernier liquide sont supérieurs à ceux fournis par la solution hydro-alcoolique de fuchsine. Cependant, il faut constater que le liquide de Horwath apporte un certain nombre d'améliorations : très grande atténuation de la mobilité des germes, et coloration satisfaisante de ceux-ci. Mais, étant donnée la viscosité de ce liquide, la vitesse de sédimentation des bactéries sur le réseau de numération se trouve considérablement ralentie; il est donc nécessaire de prolonger suffisamment le temps de sédimentation, et de le porter, au besoin, à une demi-heure.

CHOIX DE LA MÉTHODE DE WRIGHT-FRIES.

Pour toutes les raisons qui viennent d'être énoncées, nous avons préféré employer encore la méthode de WRIGHT-FRIES. Cette technique, quoique plus longue et soumise *à priori* à plus de causes d'erreurs, donne des résultats valant largement ceux que donne le compte-microbes. D'ailleurs, les cellules compte-microbes ne sont utilisables que dans les cas *d'émulsions assez riches en germes*; si ceux-ci sont trop peu nombreux, le nombre de bactéries présentes sur le réseau de numération est trop faible pour permettre un bon dénombrement. Il ne faut pas oublier l'extrême petitesse de la cellule qui n'atteint que $1/20.000$ ou $1/40.000$ de mm^3 .

Comme nous nous proposons de suivre la poussée bactérienne sous l'influence de certains ions toxiques, il aurait été très difficile de faire des déterminations précises lorsque les germes sont très peu nombreux.

Enfin, une autre raison pour laquelle nous avons préféré la technique de Wright-Fries, c'est notre plus grande habitude de cette méthode; il faut, en effet, considérer l'importance de l'expérience lentement acquise dans le maniement de toutes ces techniques.

Nous allons maintenant décrire en détail la technique de l'autre méthode que nous avons toujours employée concurremment à la méthode de Wright-Fries : *La méthode de numération des colonies développées sur milieux nutritifs solidifiés (bouillon gélosé)*; elle donne le nombre de microbes capables de se reproduire après repiquage sur milieu solidifié contenu dans un volume défini et convenablement dilué de l'émulsion bactérienne à titrer (microbes « vivants » de certains auteurs).

III. — Technique de numération des microbes capables de se reproduire après ensemencement en bouillon gélosé.

On porte préalablement au bain-marie bouillant trois tubes contenant du bouillon gélosé à 30 pour 1.000 (nous donnerons plus loin le formule et la préparation de ce bouillon). La liquéfaction de la gélose étant obtenue, on laisse refroidir jusqu'à 45° et on maintient le liquide à cette température, prêt à être ensemencé.

On effectue ensuite les dilutions. Celles-ci doivent être suffisantes pour que le nombre des colonies ne dépasse pas 400 ou 500 par plaque. Jusqu'à ce nombre, la numération à l'œil nu ou à la loupe est aisée et précise. Avec un peu d'expérience, on évalue facilement le nombre de dilutions qu'il convient de faire pour obtenir de 50 à 500 bactéries par centimètre-cube. Ces dilutions sont faites dans du sérum physiologique stérile (8 pour 1.000 de chlorure de sodium) ou de l'eau distillée stérile. Le liquide de dilution est réparti soit par quantités de 10 cm³ dans des tubes à essais, soit par quantités de 100 cm³ dans des ballons ou des fioles d'Erlenmeyer; ces récipients renferment en outre des billes de verre destinées à assurer une bonne agitation. Il est recommandable d'employer des ballons de verre Pyrex, plus épais que le verre ordinaire et résistant mieux aux chocs répétés des billes de verre.

On prélève à l'aide de pipettes stériles exactement graduées, des quantités toujours égales à *un centimètre cube*. C'est un volume relativement grand; l'erreur faite à chaque prélèvement, très faible si l'on opère avec soin, devient pratiquement négligeable. Avant chaque prélèvement de 1 cm³, le bouillon de culture ou l'une quelconque des dilutions, doit être agité très soigneu-

sement. Il faut procéder à des agitations vives dans tous les sens, de façon à obtenir des mouvements irréguliers et rapides des billes de verre dans le liquide. Remuer circulairement le milieu serait insuffisant, car il se crée un mouvement régulier de la masse entière. Une fois obtenue la dilution convenable, on en prélève 1 cm³ qu'on porte dans un tube de gélose fondue et maintenue à 45°. On roule vivement le tube entre les mains et on coule dans une boîte de Pétri stérile. On répète la même opération pour les deux autres tubes. On laisse refroidir et solidifier la gélose et on met les boîtes de Pétri à l'étuve à 37°, le couvercle en dessous. La numération des colonies peut se faire dès la 48^e heure. Leur nombre n'augmente pas par la suite, mais la numération est plus aisée si on attend le 3^e jour : les colonies développées à l'intérieur de la gélose sont un peu plus grosses et plus faciles à distinguer. Pour faire la numération sans risques d'erreur, on peut diviser le fond de la boîte de Pétri en un certain nombre de secteurs par des traits à l'encre ou au crayon gras, secteurs d'autant plus nombreux que le nombre de colonies est plus grand. On compte le nombre de colonies contenu dans chaque secteur et la somme des nombres ainsi obtenue donne la quantité de colonies pour la boîte entière. On évalue de cette façon le nombre de colonies qui se sont développées dans les trois boîtes ensemencées avec la même dilution. On prend la moyenne de ces trois numérations ; en multipliant ce nombre par le titre de la dernière dilution, on obtient le nombre de microbes capables de se multiplier sur gélose et contenus dans un centimètre-cube du liquide à examiner.

Dans cette méthode, il faudra veiller aux points suivants énoncés par J. RÉGNIER et S. LAMBIN (395) :

1° « Émulsionner soigneusement les germes par des agitations efficaces, mais non brutales, en présence de billes de verre.

2° « Diluer suffisamment les émulsions à ensemer, de telle sorte que le nombre de colonies développées par boîte de Pétri (de diamètre courant : 10 cm.) soit compris entre 10 et 400 environ.

3° « Pour effectuer les dilutions, procéder graduellement, en évitant d'effectuer directement de trop fortes dilutions.

4° « Prélever, tant pour effectuer les dilutions que pour ense-

« mencer la gélose, un volume facile à mesurer (1 cm^3 par exemple)
« de la suspension initiale ou de la dilution finale.

5° « Évaluer la concentration en germes, en dénombrant la
« *totalité* des colonies développées sur chaque boîte, en s'aidant
« de la loupe, et effectuer cette numération après un temps d'incu-
« bation suffisant (huit jours environ). Prendre comme résultat
« la moyenne des valeurs fournies par 3 boîtes au moins ».

Pour chaque détermination du nombre de microbes, nous avons toujours employé en même temps la méthode de Wright-Fries et la méthode de numération des colonies sur plaques de gélose. Cela nous a permis de contrôler et de comparer les résultats qui ont été obtenus avec ces deux techniques. De plus, nous avons trouvé qu'il serait intéressant de connaître et de comparer les nombres des deux catégories de microbes donnés par ces deux méthodes. La technique comportant la numération des colonies qui se développent sur milieux gélosés, après dilutions et ensemencement de la suspension-mère, nous fera connaître le nombre de *microbes capables de se multiplier sur un milieu différent du milieu originel* : il comprend les microbes les plus résistants (microbes « vivants » des auteurs). La méthode microscopique de Wright-Fries nous indiquera le nombre des « *microbes visibles* ». « Ceux-ci comprennent les microbes capables de se multiplier « sur milieu gélosé, les microbes qui ne peuvent se reproduire « que dans le milieu liquide dans lequel ils ont pris naissance, et « enfin les microbes morts, qui restent en suspension dans le « liquide avant de disparaître par autolyse ». (R. DAVID).

CHAPITRE TROISIÈME

VUE D'ENSEMBLE DE LA POUSSÉE MICROBIENNE

I. — Travaux fondamentaux relatifs à l'étude numérique de la multiplication microbienne.

Nous exposerons d'abord l'historique des travaux se rapportant à la multiplication microbienne; puis, de ces travaux, nous déduirons comment nous pouvons concevoir l'évolution de la poussée microbienne.

C'est l'analyse bactériologique des eaux qui fut la cause des premières études numériques sur la multiplication microbienne. Dès 1885, CRAMER (98) étudia la poussée microbienne dans un échantillon d'eau du lac de Zurich conservé pendant 70 jours. Le nombre de germes contenus dans un centimètre-cube étant initialement égal à 143, devient après 1 jour : 12.457, après 3 jours : 328.543, après 8 jours : 233.452, après 17 jours : 17.436, et après 70 jours : 2.500. En 1886, LEONE (298) étudiant la variation du nombre de microbes dans une eau courante, mise en flacon, constata que cette eau qui renfermait 5 microbes par cm^3 le premier jour, en contenait 100 le deuxième jour, 10.500 le troisième, 67.000 le quatrième, 325.000 le cinquième et atteignait le sixième jour le nombre maximum de 500.000. En 1887 et dans les années suivantes, MIQUEL (322 et 333), étudia la poussée bactérienne des eaux de la Vanne et de la Dhuis. Dans les mêmes conditions, c'est-à-dire l'eau étant mise en bouteille et la température étant de 29° à 30° , il constata que, pendant les premiers jours, la multiplication microbienne était rapide, elle passait de quelques dizaines à un ou plusieurs millions de germes, puis le nombre de microbes diminuait; toutefois, cette dernière phase était moins rapide que la première.

En 1895, FULLER (173), étudiant un échantillon d'eau d'étang,

constata au début une chute du nombre de germes, suivie d'une multiplication rapide. Ce phénomène avait déjà été signalé en 1890 par FOKKER (155) qui étudiait les variations numériques des bactéries du lait. Ce résultat fut confirmé par WHIPPLE (501) en 1901.

Mais tous ces essais n'avaient pas pour but principal une étude de la poussée bactérienne. Le milieu (eau ordinaire) avait une valeur nutritive bien faible, la race des microbes n'était pas définie et le développement se faisait à une température variable. Les auteurs suivants étudièrent la poussée microbienne pour elle-même et utilisèrent des techniques appropriées : emploi de milieux bien définis, poussée dans des conditions parfaitement connues. Dès 1887, H. BUCHNER, K. LONGARD et J. RIEDLIN (53) étudièrent la multiplication du vibron cholérique en bouillon nutritif, en effectuant le dénombrement des colonies sur plaques de gélatine. Voici à leur avis quelles étaient les meilleures conditions d'étude :

- 1° Utiliser un milieu de culture aussi favorable que possible.
- 2° Opérer à une température favorable : 37°.
- 3° Employer une culture-souche, pure et aussi vigoureuse que possible.
- 4° Ensemencer un petit nombre de microbes (quelques centaines par centimètre-cube) afin que le milieu nutritif reste le plus longtemps possible favorable à la multiplication des microbes.
- 5° Déterminer avec précision le nombre de microbes ensemencés, et le nombre de microbes existant à la fin de l'expérience.
- 6° Noter exactement la durée de l'expérience : celle-ci était courte (2 à 5 heures pour éviter l'accumulation des produits du métabolisme microbien).

Puis ces auteurs se basant sur le fait qu'une cellule microbienne se multipliait par scissiparité, et suivant un raisonnement qui est resté à la base de toutes les études sur cette question calculèrent la *durée moyenne d'une bipartition* ou *temps de génération* : soit a le nombre de microbes au début de l'expérience, b le nombre de microbes à la fin de l'expérience. Étant donné que celle-ci a duré 5 heures ou 300 minutes et que x est le nombre de bipartitions effectuées pendant cette période :

Après 1 bipartition, il y a : $a \times 2$ microbes.

Après 2 bipartitions, il y a : $a \times 2 \times 2$ microbes.

Après 3 bipartitions, il y a : $a \times 2 \times 2 \times 2$ microbes.

Après x bipartitions, il y a : $a \times x$ microbes.

Mais nous savons qu'après x bipartitions, nous avons b microbes.

Nous pouvons donc écrire : $a \times 2^x = b$

$$\text{d'ou } 2^x = \frac{b}{a}$$

$$\text{ou } x = \frac{\log. b - \log a}{\log 2}$$

Comme ces x bipartitions se sont produites en 5 heures ou 300 minutes, le *temps de génération* pendant cette période sera :

$$y = \frac{300}{x}$$

En appliquant ce raisonnement, BUCHNER (53) et ses élèves trouvèrent pour le vibrion cholérique un temps de génération variant de 20 à 40 minutes selon les expériences.

En 1895, MAX MULLER (343) étudia l'influence des températures fébriles sur la vitesse de multiplication des bactéries pathogènes. Pour cela, il fit des essais à 40° (température fébrile) et à 37° (température normale); il utilisa la méthode de numération par ensemencement sur plaques de gélose. Il ne se contenta pas de compter les microbes au début et à la fin de l'expérience, mais il fit des numérations intermédiaires à peu près toutes les 3 heures, la durée de l'expérience étant de 12 heures environ. Il constata alors un phénomène très intéressant : Dans les 2 ou 3 premières heures, il n'y avait aucune multiplication microbienne : il attribua ce phénomène à une adaptation du microbe à son nouveau milieu. Il constata la même chose en repiquant des microbes venant d'un milieu semblable; il attribua alors ce retard de poussée à une altération subie par les microbes dans le milieu souche et à la nécessité d'un temps de repos avant la multiplication dans le nouveau milieu. Il constata également, en opérant sur des cultures d'âges divers, que des cultures très récentes repiquées sur un bouillon frais avaient des temps de génération plus courts que des cultures plus âgées ensemencées dans les mêmes conditions. Cette période de latence est donc de plus courte durée et tend même à disparaître quand on fait des cultures très jeunes (âgées seulement de quelques heures). En

partant de cultures vieilles d'un ou deux jours, Muller constata donc l'existence de trois stades dans la poussée microbienne :

1^o Une période de non multiplication qui dépend de l'âge de la culture souche et qui dure au maximum 3 ou 4 heures; 2^o une période pendant laquelle les générations se succèdent avec une rapidité assez uniforme; 3^o une période au cours de laquelle la propagation s'effectue de plus en plus lentement pour finalement s'arrêter.

Ces travaux de BUCHNER (53) et de ses élèves, et ceux de MULLER (343) apportèrent déjà des notions générales très importantes qui allaient servir de base à tous les travaux ultérieurs sur la multiplication microbienne. Ce sont :

1^o L'existence d'un temps de latence.

2^o L'existence d'un temps de génération et le moyen de le calculer.

3^o L'existence d'une période de multiplication uniforme.

4^o L'existence d'une période de ralentissement.

Nous allons examiner maintenant les différentes phases de la multiplication microbienne, en indiquant les résultats complémentaires apportés par les travaux effectués après ceux de Buchner et de Muller.

II. — Etude particulière des différentes phases de la multiplication microbienne.

Signalons tout de suite que presque tous les auteurs ont suivi quantitativement la multiplication microbienne en employant la méthode desensemencements sur plaques de gélose ou de gélatine.

HEHEWERTH (221), WILSON (504), BARBER (18) utilisèrent d'autres techniques. Les deux premiers procédèrent, à la fois, à la numération microscopique de tous les germes visibles et à celle des bactéries capables de se multiplier sur milieu solidifié. Quant à Barber, il partait d'une bactérie unique dont il suivait directement la multiplication en lame-cellule, pendant un nombre considérable de générations. En suivant la multiplication des bactéries par la numération des colonies poussant sur des milieux gélosés ou gélatinés, on constate les faits sui-

vants : « Pendant un certain temps il n'y a pas d'accroissement
« apparent du nombre des microbes ; la multiplication commence
« ensuite et les nombres grandissent, d'abord lentement, puis de
« plus en plus rapidement, jusqu'à ce que les cellules se divisent
« avec une vitesse uniforme. Au bout d'un certain nombre
« d'heures, les conditions deviennent défavorables, la vitesse
« avec laquelle se multiplient les cellules diminue et finalement
« la poussée cesse entièrement. Les microorganismes présents
« restent en nombre constant pendant un temps plus ou moins
« court, puis les cellules commencent à mourir. Si l'on prolonge
« l'observation, on constate que toutes les bactéries finissent par
« disparaître, ou qu'il n'en subsiste qu'un nombre relativement
« petit. » (R. DAVID).

Il est donc possible de distinguer différentes phases dans la poussée microbienne. La durée de celle-ci est fort variable et dépend de la nature des germes étudiés et des conditions de poussée. D'ailleurs, nous étudierons plus loin ce que deviennent ces différentes phases de développement lorsqu'on modifie la composition du milieu de culture (introduction d'ions métalliques, emploi de peptones dialysées) ; auparavant, il est utile de connaître leurs caractéristiques lorsque la poussée a lieu dans les milieux habituels et dans des conditions normales.

Ces phases ont été particulièrement étudiées par HEHEWERTH (221), JANET E. LANE CLAYTON (84), MISS H. CHICK (76), PENFOLD (367), ALAN M. CHESNEY (75), CLARK et RUEHL (83), GRAHAM SMITH (456), BUCHANAN (49), WINSLOW (505). On peut les désigner de la façon suivante :

1^o *Phase de latence* : c'est le moment, succédant à l'ensemencement, pendant lequel il n'y a pas d'accroissement apparent du nombre de microbes.

2^o *Phase de multiplication constante et rapide, dite phase de multiplication géométrique ou phase de multiplication logarithmique* : pendant cette phase les cellules se divisent avec une vitesse uniforme.

3^o *Phase de multiplication ralentie* : la vitesse de multiplication des cellules diminue par suite des conditions défavorables du milieu.

4^o *Phase de maximum stationnaire* : c'est la période où le nombre de bactéries reste sensiblement constant.

5^o *Phase de destruction des bactéries* : toutes les bactéries finissent par disparaître, ou il n'en subsiste qu'un petit nombre.

WINSLOW (505), étudiant les variations de population bactérienne dans le sol, les eaux, etc., emploie d'autres dénominations :

- 1^o Phase d'ajustement.
- 2^o Phase d'accroissement.
- 3^o et 4^o Phase de crise.
- 5^o Phase d'abaissement.
- 6^o Phase de réajustement.

Nous avons retrouvé dans nos expériences l'existence de ces diverses phases et elles peuvent se distinguer facilement sur les courbes du chapitre II. Avant de passer à l'étude de chacune des phases constituant la multiplication microbienne, signalons simplement que certains auteurs, parmi lesquels MAC KENDRICK et PAI (262), ROBERTSON (413) et LOTKA (310), ne considèrent pas les courbes de multiplication microbienne comme représentant une succession de phases différentes. Ils concluent que la forme sigmoïde des courbes de multiplication exprime un phénomène voisin du phénomène de l'*autocatalyse*. Ils se basent pour cela sur l'hypothèse que la valeur de l'accroissement est constamment proportionnelle à la concentration des matières nutritives nécessaires. Sans discuter leurs résultats, remarquons toutefois que certains facteurs comme la température, la qualité et le nombre de germesensemencés, les propriétés et la constitution du milieu de culture, peuvent contribuer à modifier l'allure de la courbe de poussée. Celle-ci ne doit donc pas être considérée comme dépendant uniquement de la concentration des aliments convenables.

a) PHASE DE LATENCE.

C'est la période comprise entre l'ensemencement et le moment où les bactéries commencent à effectuer leur multiplication avec une vitesse rapide et uniforme. Cette phase, signalée pour la première fois en 1895 par FULLER (173), puis par MULLER (343), a une durée variable avec les conditions de développement. Dans le cas du bouillon ordinaireensemencé à plusieurs millions de germes, la phase de latence dure 2 à 3 heures.

BUCHANAN (49), en 1918, divise la phase de latence en deux parties : une phase pendant laquelle le nombre de microbes reste constant et une phase comportant une certaine accélération de croissance. Cependant, MYER COPLANS (90), LANE-CLAYPON (84), PENFOLD (367) ont constaté parfois une diminution du nombre des microbes, au début de la phase de latence. Il faut donc prendre en considération l'hypothèse de BUCHANAN.

Nous allons examiner maintenant quels sont les différents facteurs qui sont de nature à influencer la phase de latence.

1^o Principaux facteurs qui exercent une influence sur la durée de la phase de latence.

- Ce sont : a) la constitution des milieux de culture,
b) la température d'incubation,
c) l'espèce microbienne,
d) l'âge des souches utilisées,
e) le nombre des microbes ensemencés.

a) Influence de la constitution des milieux de culture :

Il a été naturel de considérer la phase de latence comme un temps d'accoutumance du microbe vis-à-vis du nouveau milieu où il est ensemencé. En repiquant un microbe dans un milieu auquel il était déjà accoutumé, MULLER (343), HEHEWERTH (221), MYER COPLANS (90), PENFOLD (367), constatèrent que le temps de latence diminuait, mais ne disparaissait pas. Ensemencant des colibacilles provenant d'une culture de 14 heures dans de l'eau peptonée salée et dans du bouillon dulcité, MYER COPLANS constata non seulement que la phase de latence existait pour les deux cultures malgré la jeunesse du microbe utilisé, mais qu'elle était beaucoup plus nette pour le bouillon dulcité, milieu dans lequel il constatait même une diminution du nombre de germes immédiatement après l'ensemencement. PENFOLD trouva des résultats analogues.

BARNETT COHEN et MANSFIELD CLARK (87), puis SHERMAN (447) montrèrent que la réaction du milieu jouait un certain rôle : Ayant une durée de 2 à 4 heures pour un pH compris entre 6,1 et 8,1, cette phase atteint 3 à 5 heures pour un pH inférieur à 5,5, et va jusqu'à 10-12 heures pour un pH égal à 8,9. OTTO

RAHN (387) trouva même que cette phase de latence pouvait atteindre une valeur considérable. Il étudia le *Bacillus prodigiosus* en l'ensemencant dans une solution d'asparagine, il vit celle-ci rester 4 semaines visiblement stérile; puis brusquement, le microbe déclencha sa multiplication en donnant naissance à sa pigmentation rouge caractéristique. R. DAVID (104) a retrouvé un fait analogue dans son étude de la multiplication du bacille pyocyanique en milieux synthétiques : sur les milieux de LIOT (306) et d'AUBEL (12), il observa l'existence d'une phase de latence d'au moins 6 heures et pouvant atteindre plus de 22 heures.

b) *Influence de la température d'incubation :*

Dès le début de ses recherches, HEHEWERTH (224) montra que la phase de latence augmente quand la température s'abaisse. Déjà mentionnée par WHIPPLE (501), cette influence fut retrouvée par OTTO RAHN (387), H. CHICK (76), PENFOLD (367), et JANET LANE CLAYPON (84); ce dernier, dans le cas du colibacille et du *Bacillus enteridis*, a vu passer cette phase de 1 heure à 6 heures lorsque la température décroît de 42° à 20°.

c) *Influence de l'espèce microbienne :*

HEHEWERTH, puis JANET LANE CLAYPON signalèrent encore que le temps de latence variait avec l'espèce microbienne utilisée. De même, WINSLOW (505) cita des expériences de BURKE, SPRAGUE et BORNES, montrant qu'exceptionnellement des spores ou de simples cellules peuvent présenter un développement très lent, malgré les conditions favorables ambiantes. WINSLOW signale des spores de *Bacillus subtilis*, qui sont restées 39 jours en latence, malgré des conditions très favorables. Ceci montre qu'il peut se trouver à l'intérieur d'une culture des individus de vitalités très variables. Cela vient-il de quelque dommage subi par les bactéries au moment de l'ensemencement? MYER COPLANS (90) a montré qu'une exposition prolongée au froid, ou l'action de faibles quantités d'antiseptiques, provoquait de la part des microbes une phase de latence plus importante. De même, ALLEN (7) attribue à l'action de la chaleur la poussée plus lente des bactéries du lait pasteurisé, et ESTY et MEYER

(139) ont noté que le bacille botulique pouvait avoir une phase de latence durant des jours et des semaines, après un chauffage plus ou moins grand.

d) *Influence de l'âge des microbes au moment de l'ensemencement :*

Dès 1895, MULLER (343) montra que le temps de latence est bien plus court pour des souches très jeunes que pour des souches plus âgées. Le bacille typhique, par exemple, présente un temps de latence de 40 minutes pour une souche de 2 à 3 heures, de 80 à 85 minutes pour une souche de 6 heures, et atteint 160 minutes pour une culture de 14 à 16 heures. HEHEWERTH (221), OTTO RAHN (387), MYER COPLANS (90), PENFOLD (367) et ALAN M. CHESNEY (75) confirmèrent que la phase de latence est d'autant plus longue que les bactéries ensemencées sont plus vieilles.

Mais BARBER (18) ne retrouva plus la phase de latence lorsqu'une très jeune bactérie (de 2^e ou de 3^e génération) était transportée d'un milieu de culture dans un autre milieu identique. En suivant directement au microscope la multiplication d'un seul microbe (il expérimentait avec le colibacille, le bacille typhique et le *Bacillus subtilis*), il observa que les bactéries très jeunes ainsi repiquées se multipliaient immédiatement suivant une progression géométrique. Ce phénomène trouvé par BARBER fut ensuite retrouvé par d'autres auteurs : MAC KENDRICK et PAI (262) en 1911, PENFOLD (367) en 1914, ALAN M. CHESNEY (75) en 1916.

e) *Influence du nombre des microbes ensemencés :*

OTTO RAHN (387) constata d'abord une diminution de la phase de latence lorsqu'on ensemencait un grand nombre de germes. Reprenant ces expériences, PENFOLD trouva des résultats différents, c'est-à-dire un temps de latence plus marqué dans le cas d'ensemencements faibles et peu d'influence sur cette latence pour de larges ensemencements (quelques centaines de milliers par centimètre-cube). ROBERTSON (414) fit des constatations analogues sur les infusoires ; il remarqua une poussée plus rapide lorsque ces organismes étaient ensemencés en grand nombre. Ce phénomène de stimulation mutuelle a reçu le nom d'*allélo-catalyse*. VALLEY et RETTGER (490) concluent également au même résultat, la poussée ne se déclenchant qu'avec une concentration minima de gaz carbonique.

Bien plus récemment, en 1931, J. RÉGNIER et A. KAPLAN (394) apportèrent une contribution très intéressante à ce sujet. En étudiant l'influence du nombre des microbesensemencés sur la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide, ils trouvèrent que ces bacilles commencent à se multiplier dès les premières heures; capables de se multiplier dans le milieu liquide où ils ont pris naissance, ces microbes sont incapables de se reproduire quand on les transporte sur des milieux solidifiés où les conditions de vie sont plus difficiles.

Il apparaît donc *une phase de latence quand on suit la poussée bactérienne par numération sur des milieux solidifiés*; mais si l'on considère l'ensemble des microbes, par un dénombrement au moyen de la méthode de Wright-Fries, *cette phase de latence n'existe pas*. Ces résultats ont été trouvés pour des ensemencements allant de 250.000 microbes à 10 milliards de microbes par centimètre-cube. Pour notre part, nous n'avons également jamais retrouvé la phase de latence en dénombrant les microbes visibles par la méthode de numération indirecte; nous avons observé cette phase seulement par la numération des bacilles capables de se reproduire sur milieu gélosé, c'est-à-dire après une véritable transplantation des germes d'un milieu liquide sur un milieu solide.

2° *Hypothèses émises par les différents auteurs pour expliquer l'existence de la phase de latence.*

Toutes ces hypothèses sont fort peu convaincantes; nous allons les rappeler brièvement. Elles ont plutôt un intérêt historique. Étant donné que les premiers auteurs ont accordé une grande importance à ce phénomène de latence, ils ont par suite essayé de l'expliquer au moyen de différentes théories :

1° *Théorie de l'adaptation* : Proposée par les premiers auteurs, notamment par MULLER (343), elle a été rapidement abandonnée. En effet, la latence subsiste quand on effectue des repiquages en série d'un milieu dans un autre milieu semblable.

2° *Théorie de la sécrétion diastasique* : Les bactéries devraient former une quantité suffisante de diastases pour fragmenter les substances nutritives.

3° *Théorie de la sécrétion accélérante subtoxique* : Nécessité de

petites quantités de substances toxiques pour déclencher, puis accélérer la division cellulaire.

4^o *Théorie de l'apport par les bactéries ensemencées d'une substance nécessaire à la multiplication* : La phase de latence ne cesserait qu'après production d'une substance favorable à la poussée microbienne. Elle serait thermostable et non filtrable.

Ces trois dernières théories ont été proposées par OTTO RAHN (387). Celui-ci n'a d'ailleurs pas pu les vérifier.

5^o *Théorie de l'agglutination* : Certains auteurs comme MISS H. CHICK (76) ont pensé que les bactéries s'agglutinaient pendant les premières heures de leur contact avec le nouveau milieu. Chaque amas microbien donnant une colonie, la numération sur plaques serait donc inexacte. L'expérience a montré le mal-fondé de cette hypothèse.

6^o *Théorie du rétablissement d'un dommage (injury) subi par la bactérie* : Envisagée par MULLER (343), cette théorie a été soutenue surtout par ALAN H. CHESNEY (75). Pour lui, la cellule est lésée avant son ensemencement par les produits du métabolisme microbien ; la phase de latence serait le temps nécessaire pour que la bactérie puisse reprendre son intégrité dans son nouveau milieu. Cette théorie fut discutée par PENFOLD (367) qui ne la vérifia pas entièrement.

7^o *Théorie de l'apport par les bactéries d'une certaine quantité de substance nuisible* : Cette idée a été proposée par EIJKMANN (134), mais n'a pu être vérifiée par Penfold. D'ailleurs, pas plus que la précédente théorie, elle ne permet d'expliquer pourquoi la phase de latence se produit dans un échantillon d'eau simplement conservé en bouteille.

8^o *Théorie de la sélection* : PENFOLD (367) pense que les bactéries étant différentes, il se ferait, au début de la poussée, une sélection de celles qui sont capables de se reproduire plus rapidement.

9^o *Théorie de la synthèse par échelons des corps protoplasmiques* : C'est la deuxième hypothèse de PENFOLD. Il pense que certains des constituants du protoplasma bactérien sont synthétisés par échelons, peut être grâce aux actions successives de différentes diastases. La phase de latence coïnciderait avec le

temps nécessaire à la synthèse de ces substances intermédiaires : la concentration optimum de celles-ci étant obtenue, il se déclencherait alors une multiplication rapide des bactéries. RETTGER (400), reprenant en 1918 cette conception, pensa que l'on pouvait diminuer et même supprimer cette latence par l'addition de substances capables de remplacer ces « corps intermédiaires » de Penfold. Ces substances seraient en particulier des amino-acides ou des amines.

10° *Théorie de l'inertie* : Les bactéries auraient à vaincre une « inertie » avant d'atteindre leur valeur maximum de poussée. Quoique BUCHANAN et FULMER (52) considèrent cette explication comme étant « à quelque égard, la meilleure proposée », le mot *inertie* ne semble pas beaucoup plus explicite que celui de *latence*.

11° *Théorie de la germination* : Il est connu qu'à des moments déterminés de la vie des plantes, certaines cellules passent par une phase de repos. De même, les microbes ainsi ensemencés pourraient être considérés comme des microbes à l'état de repos, et cela, sans qu'il soit possible de les différencier morphologiquement des organes de résistance tels que spores ou arthrospores. La phase de latence coïnciderait alors avec la *période germinative*. Cette hypothèse, soutenue par BUCHANAN et FULMER (52), constitue plutôt un rapprochement d'idées qu'un essai d'explication.

Toutes ces hypothèses, dont le nombre même montre la faiblesse, ne permettent pas de donner une explication de la phase de latence.

D'ailleurs, n'avons-nous pas vu plus haut que cette phase de latence semble bien ne pas exister? C'est ce que vérifieraient les travaux de BARBER (18), puis ceux de J. RÉGNIER et S. LAMBIN (393), A. KAPLAN (261), confirmés par les résultats de R. DAVID (104). Pour notre part, nous partageons avec ces auteurs l'idée que, dès l'ensemencement, les microbes visibles se multiplient déjà avec leur plus grande vitesse. Pendant les deux ou trois premières heures (correspondant à la phase de latence), il s'effectue seulement une multiplication de microbes de vitalité faible, incapables de subir un changement de milieu (d'où leur incapacité à se développer sur gélose solidifiée). « La phase de latence n'existe donc que si l'on tient compte, uniquement, des microbes en

pleine vitalité capables de se reproduire en milieux solides ». (R. DAVID) (104).

b) PHASE DE MULTIPLICATION LOGARITHMIQUE.

C'est la phase pendant laquelle *le temps de génération* (qui peut se définir comme étant le temps nécessaire à la formation d'un nombre double de bactéries par bipartition) se maintient constant et rapide. C'est encore MULLER, qui mit en évidence cette phase pour la première fois (1895).

Elle est aussi appelée *phase de multiplication géométrique*, parce que la multiplication est géométriquement accélérée, le nombre de microbes devenant toujours double dans le même laps de temps; 2 donnent 4, qui donnent 8, puis 16, 32, 64, 128, etc... Si, sur un graphique, on porte les logarithmes des nombres de microbes en fonction des temps, on constate que les points obtenus pendant cette phase se placent en ligne droite; c'est pourquoi cette phase est encore désignée sous le nom de *phase logarithmique*. Celle-ci, dans les conditions ordinaires, a une durée de 5 à 8 heures. D'après BARNETT COHEN et MANSFIELD CLARK (87), elle est comprise entre la 5^e et la 10^e heure de la multiplication.

C'est une phase très intéressante, parce que nous y voyons le type de la poussée microbienne théorique. Malgré cela, les recherches se rapportant à cette période sont beaucoup moins nombreuses que celles qui concernent la phase de latence. Les éléments caractéristiques de la phase logarithmique, tels le temps de génération et la durée de cette phase, nous donnent des indications précieuses sur la valeur d'un milieu de culture. Un milieu favorable doit permettre une poussée rapide et prolongée avec un temps de génération très court. On peut concevoir par la pensée un milieu idéal où la phase logarithmique se prolongerait indéfiniment; et c'est ce qui est réalisé grossièrement quand on repique régulièrement, et toujours dans le même milieu, les bactéries prélevées en pleine phase logarithmique. BARBER (18) a réalisé cette expérience.

Dans les conditions ordinaires de poussée, la phase logarithmique est rapidement modifiée par les changements apportés au milieu par le métabolisme microbien. Les produits de ce dernier entravent la division cellulaire qui perd alors son rythme géométrique.

Examen des facteurs qui exercent une influence sur la phase logarithmique.

1° Influence de la constitution du milieu de la phase logarithmique :

HEHEWERTH (221), MISS H. CHICK (76) ont trouvé que le temps de génération variait avec les différents milieux. PENFOLD et NORRIS (368) expérimentèrent l'influence de la concentration en principes nutritifs d'un même milieu. BARNETT COHEN et MANSFIELD CLARK (87), en 1919, étudièrent l'influence du pH sur la phase logarithmique : ils virent notamment que, en bouillon peptoné phosphaté, le colibacille avait une vitesse de multiplication sensiblement constante entre pH 5 et pH 8.

J. MORCHOISNE (339), étudiant les qualités bactériologiques de diverses peptones, trouva que le bacille pyocyanique avait une vitesse de multiplication plus rapide, pendant la phase logarithmique, dans les eaux peptonées ordinaires que dans les eaux peptonées dialysées.

Seul BARBER (18), se plaçant dans des conditions très particulières (ensemencement de bactéries isolées), trouva que la constitution des milieux de culture était sans influence sur la poussée bactérienne.

2° Influence de la température d'incubation :

MULLER (343) vit le premier cette influence, en remarquant que le temps de génération du bacille typhique augmente de 5 minutes lorsque la température passe de 37° à 40°. BARBER, étudiant cette influence sur le colibacille, constata que le temps de génération pratiquement infini au-dessous de 10°, diminue rapidement quand la température s'élève, atteint un minimum à 37° et, se maintenant à la même valeur jusqu'à 46°, augmente ensuite rapidement pour devenir infini vers 50°. LANE CLAYTON (84) confirma ces résultats et constata, en étudiant le colibacille et le *Bacillus enteridis*, que la durée de la phase logarithmique est d'autant plus courte que la température d'incubation est plus élevée. A 37°, la multiplication géométrique a une durée de 7 heures et demie ; à 30°, elle est de 8 heures et demie ; à 25°, de 15 heures et à 20°, de 24 heures. MISS H. CHICK (76), REED et REYNOLDS (391) firent des observations identiques.

3^o Influence de l'espèce microbienne :

HEHEWERTH (221), LANE CLAYPON (84) remarquèrent que le bacille typhique se multipliait plus lentement que le colibacille. De même, REED et REYNOLDS (391) trouvèrent une phase logarithmique variable en cultivant certains germes dans du lait, à 37° : 1 jour pour le *Bacterium lactis acidii* et le *Sarcina lutea*, 21 jours pour le *Micrococcus citricus* et 42 jours pour l'*Oidium lactis*. GRAHAM SMITH (456) pensa que cette vitesse de multiplication dépendait du nombre des repiquages subis par la souche avant l'ensemencement. Un repiquage préalable plus fréquent donnerait une multiplication plus rapide et plus abondante.

4^o Influence de l'âge des microbes au moment de l'ensemencement :

Nous ne connaissons pas de travaux se rapportant à cette question. Il semble d'ailleurs que cette influence, si importante pour la phase de latence, n'existe plus ici, car nous avons toujours affaire à des microorganismes de formation récente datant de la phase de latence.

5^o Influence du nombre de microbes ensemencés :

Ce facteur a été également très peu étudié. LANE CLAYPON (84) a remarqué que cette période était d'autant plus courte que les ensemencements étaient plus grands. Récemment, en 1931, J. RÉGNIER et A. KAPLAN (394) étudièrent cette influence sur la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. A cet effet, ils ensemencèrent des nombres systématiquement croissants (allant de 250.000 à 500 millions par centimètre-cube). Ils trouvèrent que la *phase logarithmique est sensiblement constante*, d'une durée de 8 heures, pouvant aller jusqu'à 10 heures au maximum. Quand le nombre des microbes ensemencés augmente, il se fait toujours une multiplication logarithmique, mais celle-ci devient d'autant plus lente que le nombre de bactéries est plus élevé.

Ce que J. RÉGNIER et A. KAPLAN mirent nettement en évidence, c'est l'augmentation du temps moyen de génération pendant la phase logarithmique en fonction de l'augmentation du nombre de microbes ensemencés; et c'est pour cette raison que

la phase logarithmique devient de plus en plus lente. Ce résultat a été trouvé pour chaque expérience toujours simultanément avec la méthode comparative de Wright-Fries et avec la méthode de numération des colonies sur plaques de gélose. C'est donc seulement le temps moyen de génération qui varie et règle ainsi la pente de la phase logarithmique. Voici un tableau extrait de la thèse de M^{me} KAPLAN (261) qui illustre très nettement ce phénomène :

	250.000 MICROBES PAR CM ³		500.000 MICROBES PAR CM ³		2 MILLIONS MICROBES PAR CM ³		10 MILLIONS MICROBES PAR CM ³		50 MILLIONS MICROBES PAR CM ³		500 MILLIONS MICROBES PAR CM ³	
	Temps de génération		Temps de génération		Temps de génération		Temps de génération		Temps de génération		Temps de génération	
	moyen	minim.	moyen	minim.	moyen	minim.	moyen	minim.	moyen	minim.	moyen	minim.
Microbes visi- bles.	51	40	46	41	56	41	72	63	130	93	210	120
Microbes ca- pables de se reproduire sur bouillon gélosé	41	28	40	30	44	29	57	34	81	63	120	100

Cette phase logarithmique, bien qu'assez peu étudiée et dont l'importance ne s'est seulement dégagée qu'à la suite des travaux de J. RÉGNIER et de ses élèves et de COHEN et CLARK (87), a un mécanisme très clair et est très bien connue au point de vue mathématique. Des formules ont été proposées par divers auteurs comme LEDINGHAM et PENFOLD (294), SLATOR (453). Un essai d'explication concernant l'existence de cette phase logarithmique a été fait en 1919 par P. F. CLARK et W. H. RUEHL (83). Ces derniers supposèrent que des substances toxiques, qui arrêtent la division cellulaire, à de fortes concentrations, peuvent au contraire favoriser la multiplication microbienne lorsqu'elles sont suffisamment diluées. Ils se basaient sur les travaux de JENNINGS qui avait montré qu'une excitation (stimulus) provoquait la fertilisation chez les infusoires, et sur les travaux de LOEB qui, avec d'autres auteurs, avait indiqué la possibilité de stimuler la division cellulaire par attaque mécanique des œufs (grenouille parthénogénétique).

c) PHASE DE MULTIPLICATION RALENTIE.

C'est la période où la multiplication se ralentit peu à peu; le nombre de bactéries augmente de plus en plus lentement; les temps de génération, ayant une durée de plus en plus longue, tendent vers l'infini. Cette phase peut durer de 12 à 24 heures. Elle a été mise en évidence par LANE CLAYPON (84), MISS H. CHICK (76), ALAN M. CHESNEY (75) et GRAHAM SMITH (456). Signalons que c'est la phase dans laquelle on se place, quand on examine une culture ensemencée la veille.

Cette période, quoique très intéressante, a été également peu étudiée. En regard du ralentissement de la poussée microbienne, il serait plein d'intérêt de suivre la formation de produits nuisibles provenant du métabolisme microbien. Des hypothèses ont été émises pour expliquer ce ralentissement de la multiplication bactérienne : comme elles s'appliquent également à la phase suivante, nous les examinerons plus loin.

d) PHASE DE MAXIMUM STATIONNAIRE.

Pendant cette période, le nombre de bactéries se maintient sensiblement constant. Ce nombre est très intéressant à connaître : il définit en quelque sorte la valeur de la poussée et il est en rapport avec la qualité du microbe et celle du milieu nutritif où se développe le bacille.

Cette période ne dure en général que quelques heures. Il n'existe malheureusement que peu de travaux au sujet de sa durée. J. L. CLAYPON a trouvé qu'elle pouvait se prolonger de 2 à 4 jours selon la température.

Il y eut également peu d'auteurs pour étudier le nombre maximum de microbes atteint. GOTSCHLICH et WEIGANG (191) constatèrent que le maximum obtenu était assez indépendant du nombre des microbes ensemencés, mais qu'il variait avec la souche utilisée et la température d'incubation. GRAHAM SMITH (456) conclut à la double influence de la quantité de matières nutritives du milieu de culture et de la température d'incubation. Par ailleurs, cet auteur ne croit pas que le ralentissement de croissance soit dû à une accumulation de substances toxiques, mais plutôt à une disparition des substances nutritives.

SMITH montra également que ce nombre maximum dépend du nombre de microbes ensemencés. Il trouve que des ensemen-

cements différents, mais faibles, donnent au bout de 24 heures des résultats très voisins, alors que desensemencements très différents conduisent à des courbes de poussée différentes. En ensemençant, par exemple, 1 milliard de germes par cm^3 , la division bactérienne sera beaucoup plus lente que si l'on ensemeince des chiffres moindres. Nous serions incomplet si nous ne citations à ce propos les conclusions de M^{me} A. KAPLAN (261) : elle a, en effet, trouvé que, quel que soit le nombre des microbes ensemencés (nombre allant de 250.000 à 500 millions de microbes par cm^3), les nombres maxima atteints, bien qu'assez différents, sont cependant du même ordre de grandeur :

De 14 à 23 milliards par cm^3 pour la totalité des microbes visibles;

De 2,5 à 9 milliards par cm^3 pour les microbes capables de se reproduire sur gélose;

Et cela pour un nombre de microbes ensemencés allant de 250.000 à 500 millions par cm^3 .

e) PHASE DE DESTRUCTION DES BACTÉRIES.

Pendant cette période, le nombre des bactéries décroît d'abord lentement, puis rapidement, pour ralentir un peu vers la fin. Ce nombre peut alors se stabiliser à un taux assez bas, la courbe représentant cette chute deviendrait asymptote (GOTSCHLICH et WEIGANG (191).

GRAHAM SMITH (456) trouve également que ce nombre, devenu très bas, peut rester ainsi presque constant pendant une longue période, ou baisser encore très lentement. Par contre, BUCHANAN et FULMER (52) pensent que cette phase de destruction rapide serait aussi logarithmique et que sa représentation graphique serait une droite de pente négative.

Ces phénomènes ont été également peu étudiés. Ils offrent certainement une analogie avec les phénomènes observés dans l'action des antiseptiques.

f) HYPOTHÈSES ÉMISES PAR DIFFÉRENTS AUTEURS POUR EXPLIQUER LE RALENTISSEMENT, PUIS L'ARRÊT DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE.

L'ensemble des trois dernières phases — phase de multiplication ralentie, phase de maximum stationnaire, phase de destruction des bactéries, — peut se dénommer *phase de déclin de*

la *multiplication microbienne*. Les causes qui la provoquent sont encore mal connues; les hypothèses essayant de l'expliquer peuvent être divisées en deux groupes :

1^o Arrêt de multiplication par épuisement du milieu.

2^o Arrêt de multiplication par accumulation de substances résultant du métabolisme microbien (accumulation d'acides, de bases, de produits résiduels toxiques), ou de produits secrétés par les bactéries (sortes de toxines).

EIJKMANN (134), en 1904, envisagea et essaya de vérifier ces deux hypothèses. Chauffant un milieu ayant déjà servi à la culture d'une bactérie, il constata que ce milieu était alors de nouveau favorable à la poussée de cette même bactérie. Étudiant une culture de colibacille sur gélatine, il montra également qu'il suffisait de filtrer sur bougie ce milieu où du colibacille s'était développé, pour le rendre apte à une nouvelle culture. Puis il établit que ces « *substances empêchantes* » étaient également diffusibles. Dans ce but, il trempa une feuille de papier dans la gélose fondue; il obtint sur les deux faces de la feuille une mince couche de ce milieu nutritif. Il ensemença l'un des côtés avec du colibacille; trois jours après, retournant la feuille il ensemença l'autre côté avec le même microbe : il n'obtint aucune culture. La feuille, chauffée alors durant 30 minutes à 65°, fut réensemencée et il constata le développement du colibacille.

Ces expériences de EIJKMANN mettent donc en évidence que l'arrêt de croissance microbienne est dû à la production de *substances empêchantes diffusibles, thermolabiles et non filtrables*. En 1906, OTTO RAHN (387) aboutit à la même conclusion en étudiant le développement du *Bacillus fluorescens liquefaciens* en bouillon peptoné salé; après chauffage ou filtration sur argile, il obtenait une nouvelle et vigoureuse croissance. ALAN M. CHESNEY (75) remarqua que le vieillissement de la culture semblait rendre bien moins actives les substances responsables de l'arrêt de la multiplication microbienne.

De même, certains auteurs : MIQUEL (333), FRANKLAND (156) avaient déjà observé antérieurement des faits semblables. Signalons encore que WEICHARDT (500), NINIC et MOLINARY (353), STEPHENSON (467), ZIEGLER et HALVORSON (526), considèrent qu'il se forme des produits inhibant la multiplication microbienne par suite de la décomposition des protéines.

Tous ces travaux tendent donc à montrer que l'arrêt de la multiplication microbienne ne provient pas de l'épuisement du milieu, mais qu'il semble résulter de l'accumulation de substances inhibitrices dans ce milieu.

Passons maintenant en revue les auteurs qui attribuent à l'épuisement du milieu ce déclin de la poussée microbienne.

En 1911, MAC KENDRICK et PAI (262) pensent que le degré de multiplication est proportionnel à la concentration de la substance nutritive. En 1920, GRAHAM SMITH (456) soutient la même théorie, tout en observant qu'il existe une sorte de spécificité dans la destruction des substances nutritives. F. SCHWEINBURG (437) estime que l'action inhibitrice d'un bouillon de culture sur la poussée microbienne est due à l'épuisement ou à la diminution des matières nutritives de ce milieu.

L. A. BARNES (19) considère également que l'influence inhibitrice des filtrats de culture sur la croissance des bactéries est due à une altération des matières nutritives nécessaires, plutôt qu'à la présence d'un agent inhibiteur.

Cette spécificité dans la destruction des substances nutritives avait déjà été entrevue par EIJKMANN (134). Cet auteur avait, en effet, remarqué qu'un milieu devenu inapte à la poussée d'un microbe était encore favorable à la multiplication d'autres organismes. GRAHAM SMITH constata, lui aussi, ce phénomène. Il remarqua également qu'après une stérilisation des cultures par ébullition, le même microbe étant réensemencé, il pouvait s'y multiplier de nouveau. Il pensa que la chaleur libérait quelque substance utile à la poussée des microorganismes.

En 1924, J. EFFRONT (128), estimant qu'il n'est pas possible d'expliquer l'arrêt d'une fermentation par l'épuisement du milieu, ni par l'accumulation de certaines substances fabriquées par ces organismes, attribua ce ralentissement de poussée à une modification dans la répartition des différents éléments nutritifs. D'après lui, les proportions des substances nutritives d'un milieu de culture sont caractéristiques de ce milieu. Au cours de la fermentation, les variations produites dans la composition du bouillon nutritif se traduisent par une modification de l'équilibre de ces différentes substances. Ce sont ces changements qui permettraient d'expliquer les différentes phases de la fermentation.

D'autres auteurs enfin émirent l'hypothèse que les microbes sécrèteraient ou libéreraient (autolyse, désintégration rapide, etc.)

des substances inhibitrices analogues à des toxines qui « vaccinaient » le milieu contre ces microbes. BESREDKA (37 à 38 bis) et ses élèves ont étudié ces milieux dits « vaccinés » et ont montré que même si cette « immunité » manque dans le premier filtrat d'une culture parvenue à la fin de son développement, elle existera dans les filtrats d'une seconde ou d'une troisième culture, obtenues en réensemencant ces filtrats successifs. Besredka donne le nom « *d'anti-virus* » à la substance thermostable, atoxique et spécifique, à qui il attribue cette action inhibitrice. Cette substance à propriétés vaccinales a conduit cet auteur à la préparation d'un pansement antistaphylococcique et antistreptococcique et d'un vaccin anticholérique.

En fait, la question s'avère très complexe et elle ne peut recevoir une solution simple et valable pour tous les milieux et tous les microbes. Ce ne sera pas le même phénomène qui arrêtera une fermentation lactique ou le développement d'un microbe dans un bouillon de culture ordinaire. De plus, l'explication valable pour un microbe se développant dans tel milieu ne l'est plus pour ce même microbe poussant dans tel autre milieu. C'est ainsi que COHEN et CLARK (87) ont montré que la durée du temps de génération était influencée non seulement par le pH, mais encore par la nature de l'acide ayant servi à la neutralisation du milieu. De plus, il est possible de dissocier la multiplication des cellules de levure de la fermentation; celle-ci peut continuer sans que la multiplication ait lieu.

En résumé, avec J. RÉGNIER et A. KAPLAN nous dirons que cette phase de déclin de la multiplication peut provenir :

1^o soit de l'épuisement de certains matériaux nutritifs, peut être parmi ceux que nous considérons comme peu importants;

2^o soit de l'accumulation de produits nuisibles formés par le métabolisme;

3^o soit de l'accumulation même des corps microbiens.

Cette dernière hypothèse introduite par ces auteurs est très intéressante et elle est basée sur les phénomènes suivants : Ainsi que nous l'avons mentionné précédemment, J. Régnier et A. Kaplan ont observé que le nombre de microbes ensemencés a une influence très nette sur le cours de la multiplication. Augmentant le nombre des microbes ensemencés (ils expérimentèrent sur des nombres allant de 250.000 à 500 millions de germes par cm³), ils virent qu'il y avait, non un raccourcissement

de la phase logarithmique, mais un ralentissement du rythme constant de multiplication qui règle cette phase. Et ils constatèrent ce fait *dès le début de l'ensemencement*, sans qu'il y ait eu vraisemblablement diminution appréciable des produits nutritifs, ni mise en liberté d'une quantité suffisante de produits nuisibles. « Il est donc possible, concluent-ils, que les microbes apportent en eux-mêmes (charge électrique? ou autre phénomène?) la cause du ralentissement de la multiplication ».

A l'appui de cette hypothèse, il faut remarquer que le maximum atteint dans les expériences de J. Régnier et A. Kaplan est toujours sensiblement le même : de 14 à 23 milliards pour les microbes visibles et de 2,5 à 9,9 milliards pour les microbes capables de se reproduire sur gélose.

MAC KENDRICK et PAI (262) ont signalé aussi que le nombre final atteint dans des cultures de 14 heures était pratiquement indépendant de la grandeur de l'ensemencement

Il semble donc qu'à un certain moment les microbes se gênent et il semble aussi que ce n'est pas seulement la diminution de produits nutritifs ou la mise en liberté de produits nuisibles qui interviennent. Sur les conseils de J. RÉGNIER, nous avons ensencé une quantité égale ou supérieure à ce maximum de façon à voir si la multiplication est très ralentie dès l'ensemencement. Les chiffres exposés ci-dessous montrent que, en effet, il y a un freinage immédiat ou une faible multiplication. (La méthode de numération employée a été la méthode comparative de Wright-Fries) :

	Nombre ensemencé	Nombre atteint	Heure de ce nombre
Expérience I.	26.095.000.000	27.680.000	15 h.
Expérience II	7.407.200.000	11.750.000.000	16 »
		20.680.000.000	20 »
Expérience III.	12.750.000.000	22.200.000.000	15 »
		22.500.000.000	30 »
Expérience IV.	64.800.000.000	68.400.000.000	15 »
		108.000.000.000	24 »
Expérience V	109.500.000.000	117.000.000.000	15 »
		103.500.000.000	45 »
Expérience VI.	66.500.000.000	93.000.000.000	15 »
		76.500.000.000	45 »

Par conséquent, l'hypothèse d'après laquelle les microbes pourraient apporter en eux-mêmes (charge électrique ou autre phénomène?) la cause du ralentissement de la multiplication, semble justifiée par ces quelques résultats que nous nous bornons à donner ici succinctement, nous réservant le soin de compléter ces expériences dans des travaux ultérieurs. Quant à l'essai de vérification de cette hypothèse, ce sera l'objet de la troisième partie de ce travail.

III. — Comparaison, au cours de la multiplication microbienne, du nombre des microbes « visibles » au nombre des microbes dits « vivants ».

Très peu de travaux existent à ce sujet.

HEHEWERTH (221), en 1901, employa en même temps la méthode de KLEIN (264) pour déterminer la totalité des germes, et la méthode de NEISSER (349) pour dénombrer les microbes capables de se reproduire sur plaques de gélose. Étudiant par ces deux méthodes la multiplication du vibrion cholérique, du colibacille et du bacille typhique sur gélose, il observa qu'en faisant cette comparaison à des heures diverses de la multiplication, le nombre total de bactéries (bactéries visibles) est toujours supérieur au nombre de microbes « vivants ». Plus la culture vieillit, plus cette différence devient considérable. Rappelons que c'est HEHEWERTH qui mit en évidence le temps de latence en utilisant desensemencements très faibles et en employant uniquement la méthode des plaques de Neisser.

WILSON (504), en 1922, fit des recherches identiques et aboutit aux mêmes conclusions. Il remarqua cependant que dans certains cas, vers le milieu ou à la fin de la période logarithmique, ces deux nombres pouvaient être identiques, mais il ne put expliquer ce phénomène. A la suite de ces résultats, il modifia la formule de BUCHNER (53) permettant le calcul du nombre de bipartitions capables de se produire dans un temps donné. La *formule de Buchner* suppose que le nombre de germes double après chaque génération; mais en voyant que le nombre de microbes visibles était plus grand que celui des microbes vivants, Wilson pensa qu'une certaine proportion seulement des germes formés est capable de se reproduire : si 80 pour 100 seulement

des bactéries peuvent se reproduire, la formule de Buchner :

$$x = \frac{\log b - \log a}{\log 2} \quad \text{devient} \quad x = \frac{\log b - \log a}{\log 1,6}$$

et donne un temps de génération plus grand que les temps calculés par les différents auteurs.

Ces conclusions de Wilson sont cependant discutables, et c'est peut-être une erreur d'admettre que les microbes transplantés sur un milieu solide et pouvant y donner des colonies, peuvent seuls se développer dans leur milieu liquide originel. Il est regrettable que, dans les nombreux travaux sur la multiplication microbienne, les auteurs n'aient pas songé à utiliser parallèlement deux méthodes de numération, qui, en donnant des résultats identiques ou divergents, auraient pu faire entrevoir bien des phénomènes nouveaux.

J. RÉGNIER (393 et 394) et ses collaborateurs ont toujours employé parallèlement deux méthodes de numération (méthode comparative de Wright-Fries, et méthode des plaques). Sur ses conseils, nous avons également employé ces deux méthodes. Cela nous a permis de confronter les résultats trouvés au moyen de chacune de ces techniques, de les comparer, et d'essayer de les interpréter. Cela nous a permis en outre d'étudier le rapport :

Microbes capables de se produire sur gélose

Totalité des microbes visibles.

qui peut être en quelque sorte considéré comme un « *rapport de vitalité* ».

CHAPITRE QUATRIÈME

CONSTITUTION DU MILIEU DE CULTURE UTILISÉ DANS NOS ESSAIS. — CHOIX DE LA PEPTONE

Nous proposant de rechercher l'influence de certains cations sur la multiplication microbienne, le choix du milieu de culture était important à déterminer. Nous avons pensé qu'il était préférable d'employer un milieu aussi simple que possible, mais apportant cependant tous les éléments indispensables à la poussée bactérienne. Dans ce but nous avons utilisé une simple solution de peptone. En effet, une peptone bien définie paraît être seule capable d'apporter avec régularité la totalité des éléments azotés nécessaires, tout en permettant au milieu de rester très favorable au croît microbien. Cette peptone contient une certaine quantité de sels; nous avons estimé qu'il était nécessaire d'en éliminer la plus grande partie, afin que les modifications de poussée apportées par l'addition de certains éléments en quantités définies ne soient pas masquées par l'action des sels déjà existants dans la peptone.

Nous avons purifié la peptone des sels qu'elle contenait par une dialyse prolongée de sa solution. La peptone ainsi obtenue ne contenait plus que des traces de sels, traces suffisantes pour permettre encore une bonne multiplication des microbes.

Afin de mieux situer la peptone que nous avons choisie, nous rappellerons tout d'abord succinctement la classification des peptones ainsi que leurs principales propriétés. Après avoir indiqué les caractères de la peptone choisie, nous exposerons sa purification par dialyse et nous dirons ce qu'est devenue sa valeur bactériologique.

I. — Définition, préparation, composition et valeur bactériologique des différentes peptones.

DÉFINITION

Nous emprunterons cette définition à la Pharmacopée française : « On désigne sous le nom de peptones un mélange de composés solubles obtenus par l'action de la pancréatine ou de la pepsine sur les matières albuminoïdes ».

PRÉPARATION

Il existe deux types de peptones suivant le ferment employé dans leur préparation : les peptones pepsiques et les peptones pancréatiques.

1^o *Peptones pepsiques* :

La pepsine ne pouvant hydrolyser qu'en milieu acide, le pH nécessaire sera obtenu en utilisant différents acides tels que : acide chlorhydrique, acide tartrique ou acide sulfurique.

a) *Peptones dites chlorhydropepsiques*. — Voici le mode de préparation tel qu'il est indiqué au supplément de 1895 du Codex 1884.

Viande de bœuf désossée et dégraissée	1.000 gr.
Eau distillée	5.000 gr.
Pepsine extractive officinale	20 gr.
(titre 50, 1/2 du titre actuel)	
Acide chlorhydrique officinal	50 gr.
Bicarbonate de sodium	QS.

La viande hachée est mélangée avec l'eau dans laquelle on a délayé la pepsine. On ajoute l'acide chlorhydrique et on laisse digérer 6 à 8 heures à 50° en agitant fréquemment. L'opération est terminée quand 10 cm³ du liquide filtré *et refroidi* ne troublent plus par addition de XXX gouttes d'acide nitrique. On filtre, on sature exactement par du bicarbonate de sodium et on évapore à siccité sans dépasser 75°. Ce mode de préparation fut dû à PETIT (371) en 1881. Ces peptones contiennent une assez grande quantité de chlorure de sodium, produit au cours de la neutralisation. La présence de ce sel peut constituer un inconvé-

nient, non seulement pour les usages pharmaceutiques, mais encore pour les usages bactériologiques (introduction d'une trop forte proportion de chlorure de sodium dans les milieux de culture).

b) *Peptones dites pepsino-tartriques*. — PETIT a proposé de remplacer l'acide chlorhydrique par l'acide tartrique. Après filtration, le liquide est séparé en deux fractions égales : une moitié est saturée par du bicarbonate de potassium et on y ajoute l'autre moitié. Il se forme du bitartrate de potassium dont une partie précipite immédiatement. On filtre, on évapore à consistance sirupeuse ; on laisse refroidir ; il se forme à nouveau un dépôt cristallin de bitartrate de potassium ; on décante et on évapore au bain-marie à siccité. D'après DESNOYERS, ces peptones ayant subi une désintégration plus profonde renferment une plus grande proportion d'acides aminés. De plus, elles ne contiennent pas de chlorure de sodium.

Il existe dans le commerce plusieurs peptones pepsino-tartriques, parmi lesquelles : les peptones CHAPOTOT, préparées à partir de la viande de bœuf ; les peptones de WITTE, préparées à partir de la fibrine de bœuf ou de cheval.

c) *Peptones sulfuriques*. — Dans ses recherches sur les qualités bactériologiques des diverses peptones, J. MORCHOISNE (339) a notamment étudié la peptone de muqueuses. Il a observé que la dialyse diminuait considérablement sa valeur bactériologique ; aussi nous n'insisterons pas sur ces peptones.

2^o *Peptones pancréatiques* :

Ces peptones se préparent comme les peptones pepsiques, mais la pancréatine n'agissant qu'en milieu neutre ou faiblement alcalin, on supprime toute addition d'acide et on ajoute une petite quantité de carbonate de sodium (cette addition n'est d'ailleurs pas indispensable).

COMPOSITION DES PEPTONES

Celle-ci dépend des protéïdes ayant servi à leur fabrication (viande, poisson, fibrine, sang, caséine, gélatine, etc.) et du ferment utilisé. Les variations dans la nature et la proportion

des amino-acides qui caractérisent les matières protéïques se retrouveront nécessairement dans les peptones qui en sont issues.

Rappelons simplement que les peptones pepsiques ne renferment que des albumoses, des peptones proprement dites et des polypeptides abiurétiques, avec des traces de tyrosine; que les peptones pancréatiques contiennent toujours des acides aminés parmi lesquels le tryptophane, la tyrosine et la leucine. L'influence de ces peptones sur le croît bactérien sera favorable ou défavorable selon la présence ou l'absence de tel ou tel acide aminé. Cette influence de la nature des peptones sur la biologie des bactéries a été signalée par L. GRIMBERT; elle a été étudiée par L. BOEZ, par A. BERTHELOT, G. RAMON et M^{lle} AMOUREUX (29).

VALEUR BACTÉRIOLOGIQUE DES DIVERSES PEPTONES.

Les travaux de J. RÉGNIER, R. DAVID (104) et J. MORSCHOISNE (339) ont montré que, pour le *bacille pyocyannique*, la valeur bactériologique d'une peptone dépend plus de la matière première utilisée pour sa préparation que du ferment employé :

1^o Les *peptones de viande* (peptones pancréatiques ou peptones pepsiques), la *peptone de muqueuse* permettent une excellente multiplication du bacille pyocyannique.

2^o Les *peptones de caséine* (peptones pancréatiques ou peptones pepsiques) conviennent également bien, quoique la multiplication soit un peu plus lente.

3^o La *peptone de fibrine* change un peu l'allure de la poussée. Le nombre maximum de bacilles « visibles » et de bacilles capables de se reproduire après repiquage sur gélose, est très élevé, mais il est obtenu très tardivement.

4^o La *peptone de gélatine* paraît être la moins favorable et la quantité de germes formés est peu élevée (cela est peut-être dû à l'absence du tryptophane et de la tyrosine dans ces peptones).

II. — Peptone utilisée dans nos essais.

Pour la préparation de l'eau peptonée dialysée destinée à nos expériences, nous avons utilisé une *peptone pepsique* préparée par les laboratoires Byla. C'est une poudre jaune pâle, à saveur amère et salée, très soluble dans l'eau. Cette peptone est utilisée

à la Pharmacie centrale des hôpitaux pour l'essai des catguts. Nous allons voir (travaux de J. RÉGNIER, R. DAVID et J. MORCHOISNE (397)), que cette peptone convient en effet très bien à la multiplication microbienne. De plus, théoriquement, il doit être préférable de dialyser des peptones pepsiques plutôt que des peptones pancréatiques, parce qu'il y a moins d'acides aminés (dialysables) dans les premières.

A) Propriétés.

J. MORCHOISNE (339) a étudié la multiplication du bacille pyocyanique dans une telle peptone, dont il avait préalablement recherché et déterminé les propriétés physiques et chimiques, et dosé les principaux constituants. Nous donnons sous forme de tableau-résumé les résultats trouvés par cet auteur :

pH.....	Méthode colorimétrique de CLARK et LUBS.	7,4
Tension superficielle....	Avec pipette de Duclaux (5 cc. eau dist. = 100 gouttes).	114
Déviat. polarimétrique	Avec polarimètre de Laurent.	70°
Réaction à l'eau de brome	Technique du Codex.	négative.
Réaction de la tyrosinase	Technique de HARLAY (212).	négative.
Cristaux { de leucine ..	Technique de M. JAVILLIER (249).	examen négatif.
	{ de tyrosine..	
Azote total.....	Destruction de la matière organique (Méthode de DENIGÈS). Dosage acidimétrique de l'ammoniaque (appareil de MEILLÈRE et de SAINT-RAT.	1,34
Azote amino - ammoniacal	Méthode de SORENSEN-MESTREZAT (322).	0,247
Azote ammoniacal	Procédé à la cloche de SCHLÆSING.	0,053
Azote aminé	Azote amino - ammoniacal. Azote ammoniacal.	0,194

Azote formol	18
Azote total	
Carbone	<i>Méthode de NICLOUX (352)...</i> 4,98
Carbone	3,72
Azote	
Phosphore total	<i>Méthode de H. COPAUX (89), Mme HINGLAIS (234).</i> 0,0040
Phosphore organique ..	<i>Technique de P. FLEURY et Z. SUTU (154).</i> 0,026
Phosphore minéral	<i>P. total. — P. organique.</i> 0,014
Chlorures (en NaCl). ...	<i>Méthode cyano - argentimé- trique de DENIGÈS.</i> 1,06
Sulfates (en S).....	<i>Technique de CHATRON (74)..</i>

B) *Dialyse de cette peptone.*

Dans le but d'étudier l'action particulière de certains cations sur la multiplication microbienne, nous avons pensé qu'il était préférable d'opérer sur des solutions de peptones très pauvres en sels, afin de réduire au minimum les perturbations provoquées par ceux-ci sur l'action propre des cations étudiés. C'est pourquoi nous avons cherché à éliminer la plus grande partie des sels apportés par la peptone en la dialysant.

De plus, une telle solution de peptone dialysée constitue un milieu naturel très simple, bien défini et purifié; il présente des avantages en ce qui concerne l'apport des substances azotées et il permet d'obtenir, ainsi que nous allons le voir, une bonne multiplication du bacille pyocyanique.

Par addition à ce milieu de quantités bien déterminées de sels dont nous voulions étudier l'influence, nous avons pu mettre en évidence leur action sur la poussée de ce bacille.

Nous avons effectué la dialyse en utilisant la méthode de GRAHAM. Voici le détail de nos manipulations :

On dissout la peptone dans une petite quantité d'eau distillée (nous avons toujours employé des solutions contenant 30 gr. de peptone pour 200 cm³ d'eau distillée). Cette solution est portée à l'ébullition pendant 2 à 3 minutes, puis filtrée. Le liquide refroidi est alors versé dans un dialyseur de Graham muni d'une membrane de papier parchemin.

Ce dialyseur est placé sur un cristalliseur contenant de l'eau distillée (environ 3 litres) : les niveaux de la solution à dialyser et de l'eau distillée extérieure doivent être aussi voisins que possible.

Afin d'éviter la production de fermentations microbiennes et le développement des moisissures, le dialyseur est constamment maintenu à la glacière. Nous avons prolongé cette dialyse pendant 15 jours. L'eau du cristalliseur dans laquelle passent les sels ayant traversé la membrane était changée plusieurs fois par 24 heures, c'est-à-dire quatre fois pendant les premiers jours, puis deux fois pendant les derniers jours. Au bout de ce temps, la solution de peptone ne renfermait plus de chlorures décelables par l'azotate d'argent.

Cette solution était diluée de façon à titrer 20 grammes de peptone par litre. Le pH était ajusté à la valeur 7,0 par addition d'une solution d'ammoniaque pure. Nous avons écarté l'emploi d'une solution de soude, parce que celle-ci contient toujours des sels en quantité appréciable. Cette solution de peptone était enfin répartie dans des ballons-pyrex et stérilisée à 115° pendant 20 minutes. Elle était alors prête à être expérimentée.

	Avant dialyse	Après dialyse	Quantité disparue	Quantité disparue pour 100
pH	7,4	7,3		
Tension superficielle	114	108		
Déviations polarimétrique	—42'	—28'		
Azote total	1,34	0,91	0,43	33
Azote amino-ammoniacal	0,247	0,084	0,163	70
Azote ammoniacal	0,053	0,014	0,039	73,5
Azote aminé	0,193	0,070	0,123	64
Azote formol				
Azote total	18	9,5		
Carbone	4,98	3,49	1,49	30
Carbone				
Azote	3,72	3,83		
Phosphore total	0,040	0,017	0,023	57,5
Phosphore organique.....	0,026	0,017	0,009	34,5
Phosphore minéral.....	0,014	0	0,014	100
Chlorures	1,06	0,388	0,672	63,5

C) Caractères de cette solution de peptone dialysée pendant 48 heures.

J. MORCHOISNE (339), dans son étude sur les qualités des diverses peptones, a effectué des mesures physiques et dosé les principaux éléments de la peptone pepsique dialysée. Ses résultats caractérisent une peptone dialysée pendant 48 heures. A titre de comparaison, nous les indiquons dans le tableau ci-dessus avec les valeurs correspondant à une solution de peptone non dialysée.

Nous constatons donc une diminution très nette de tous les éléments étudiés. Le phosphore minéral notamment a pratiquement disparu. Quant aux chlorures, 63,5 % de leur quantité a été éliminé.

D) Caractères de la solution de peptone dialysée pendant 15 jours.

Cette élimination des sels, nous intéressant particulièrement, nous avons fait quelques mesures qui concernent, d'une part, la quantité de chlorure (ceux-ci ont été choisis parce qu'ils sont les plus abondants parmi les sels de notre peptone), et, d'autre part, la quantité de l'ensemble des sels qui restent après 15 jours de dialyse. Pour avoir une idée précise de la quantité totale de sels avant et après la dialyse, nous avons procédé à la mesure de la conductivité électrique de notre milieu.

1^o Quantité de chlorures contenue dans les solutions de peptone expérimentées :

a) Méthode de dosage employée :

Nous avons employé la méthode cyano-argentimétrique de DENIGÈS, qui permet de doser avec précision de petites quantités de chlorures; il n'est en effet pas possible d'effectuer de tels dosages avec les méthodes de MOHR ou de CHARPENTIER-VOLHARD. Cette méthode étant bien connue, nous n'en rappellerons que très succinctement la technique : On introduit 20 à 50 cm³ de solution de peptone (selon la richesse du milieu étudié) dans un ballon jaugé de 100 cm³; on ajoute 2 à 3 cm³ d'acide nitrique et une quantité variable de solution de nitrate d'argent

N/50 (de 10 à 40 cm³, ce volume dépend du titre en chlorures de la prise d'essai). On complète à 100 cm³. On agite et on filtre sans cendres. On recueille 50 cm³ de filtrat (ceux-ci correspondent à la moitié de la quantité de nitrate d'argent N/50 employé); on l'additionne d'un excès d'ammoniaque (environ 15 cm³), d'une quantité de solution de cyanure de potassium N/50 égale à la moitié de la quantité de nitrate d'argent ajoutée au début de l'expérience et d'un peu de solution d'iodure de potassium à 10 %. On ajoute alors du nitrate d'argent N/50 jusqu'à opalescence. Si N représente le nombre de centimètres cubes de nitrate d'argent employés, la quantité de chlorures contenue dans la prise d'essai est (en chlorure de sodium) :

$$\text{Chlorures (en Na Cl)} = N \times 0 \text{ gr. } 00117 \times 2.$$

b) *Résultats obtenus* :

En ce qui concerne la quantité de chlorures contenue dans une solution de peptone non dialysée, nous avons trouvé des valeurs approchant celles qu'a trouvées J. MORSCHOISNE. Nous donnons un peu plus loin le résultat moyen de trois dosages effectués sur le lot de peptone bien homogénéisé, à partir duquel nous avons préparé tous nos bouillons dialysés. Quant aux solutions de peptone ayant subi une dialyse de 15 jours, les dosages ont montré qu'elles ne contenaient plus que des quantités égales ou inférieures à la moitié de celles contenues dans une solution de peptone n'ayant subi qu'une dialyse de 48 heures. Voici quelques résultats se rapportant à des solutions de peptones, qui ont été dialysées afin d'être utilisées dans les expériences dont nous parlerons plus loin.

Solution de peptone N ^o	SOLUTION DE PEPTONE A 20 GR. POUR 1000 CM ³	
	Quantité de chlorures avant dialyse	Quantité de chlorures après 15 jours de dialyse
1	2 gr. 28 (résultat moyen de 3 dosages)	0 gr. 005
2	»	0 gr. 007
3	»	0 gr. 005
4	»	0 gr. 01
5	»	0 gr. 004

2^o Quantité totale de sels contenue dans les solutions de peptone expérimentées :

a) *Méthode de dosage employée :*

Nous avons déterminé cette valeur en mesurant la conductivité électrique des solutions de peptones utilisées. Cette mesure a été effectuée avec la méthode classique basée sur le principe du pont de KOHLRAUSCH. Nous avons employé un audit-ohmmètre (CHAUVIN et ARNOUX) muni d'un récepteur téléphonique et permettant la mesure des résistances comprises entre 0,1 ohm et 20 mégohms. Nous avons employé la technique habituelle très connue, aussi nous n'en parlerons pas.

b) *Résultats trouvés :*

Voici les résultats concernant les valeurs de la conductivité de quelques solutions de peptone dialysée, que nous avons employées dans nos essais :

Solution de peptone N ^o	Conductivité de la solution de peptone après 15 jours de dialyse
1	3.10^{-4}
2	$2,6.10^{-4}$
3	3.10^{-4}
4	9.10^{-4}
5	$2,2.10^{-4}$

Les résultats que nous venons d'exposer, montrent clairement qu'il ne reste plus qu'une très faible quantité de sels, dans les solutions de peptones dialysées devant servir aux expériences dont nous allons parler dans la deuxième partie de ce travail. De plus, si nous considérons en particulier les sels suivants : chlorures, phosphates, sulfates, rappelons que nous venons de montrer que les solutions de peptones dialysées contiennent moins de un centigramme de chlorure par litre, et que les travaux de J. RÉGNIER, R. DAVID et J. MORCHOISNE ont mis en évidence que le phosphore minéral est complètement éliminé après 48 heures de dialyse et que les sulfates sont inexistants dans la peptone pepsique employée.

E) *Valeur bactériologique de la peptone pepsique non dialysée et de la peptone pepsique dialysée pendant 48 heures.*

La valeur bactériologique d'une peptone sera d'autant plus grande qu'elle permettra un développement microbien plus abondant et plus rapide.

J. RÉGNIER, R. DAVID et J. MORCHOISNE, déterminèrent la valeur bactériologique d'une peptone en suivant la poussée du bacille pyocyanique ensemencé dans ce milieu.

Dans ce but, ils ensemencent un nombre déterminé de germes (500.000 par cm³) et ils effectuent, à intervalles déterminés, le dénombrement des « *bacilles visibles* » (par l'emploi de la méthode comparative de Wright-Fries) et celui des microbes capables de se multiplier après repiquage sur milieux gélosés (par l'emploi de la méthode dite « des plaques »).

Voici les résultats d'une expérience effectuée par ces auteurs pour la *peptone pepsique non dialysée* :

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE		
	Chiffres moyens trouvés	Logarithmes	Temps de génération entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Logarithmes	Temps de génération entre 2 périodes
0 h.	500.000	5,69	53'	349.000	5,54	171'
2 h.	2.415.000	6,38		570.000	5,75	63'
4 h. 30'			62'	2.960.000	6,47	
5 h.	18.165.000	7,25	113'			61'
8 h.	54.740.000	7,73	136'	32.300.000	7,50	
23 h.	5.483.000.000	9,73	1227'	3.865.000.000	9,58	130'
32 h.	7.450.000.000	9,87		2.680.000.000	9,42	
48 h.	2.659.000.000	9,42				
3 jours	1.892.500.000	9,27		1.165.000.000	9,06	
4 jours 1/2	1.273.000.000	9,10		528.000.000	8,72	
6 jours 1/2	779.000.000	8,89		61.600.000	7,78	
10 jours	290.5000.00	8,46		29.145.000	7,46	

Nous donnons maintenant le tableau des résultats concernant une poussée microbienne sur la même peptone pepsique qui a subi une dialyse de 48 heures.

Nous pouvons ainsi comparer ces deux sortes de résultats et voir si les grandes pertes en sels (notamment phosphates et chlorures), azote aminé, azote ammoniacal, occasionnées par la dialyse sont néfastes au croît microbien. Nous verrons qu'il n'en est rien.

ÂGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES			MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE		
	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de généra- tion entre 2 périodes	Chiffres moyens trouvés	Loga- rithmes	Temps de généra- tion entre 2 périodes
0 h.	500.000	5,69	102'	450.000	5,65	1500'
2 h.	1.130.000	6,05	75'	478.000	5,67	70'
7 h. 30	24.215.000	7,38	125'	12.830.000	7,10	128'
24 h.	5.839.000.000	9,76		2.833.000.000	9,45	
33 h.				1.500.000.000	9,17	
47 h.	1.635.500.000	9,21		1.066.500.000	9,02	

COMPARAISON DE LA POUSSÉE EN SOLUTION DE PEPTONE NON DIALYSÉE ET EN SOLUTION DIALYSÉE.

Les résultats obtenus sont donc tout à fait comparables. Le bacille pyocyanique se multiplie sensiblement de la même façon dans la solution de peptone pepsique dialysée que dans la solution de cette même peptone non dialysée.

Voici un tableau comparatif des résultats concernant les peptones pepsiques dialysées et non dialysées, où l'on peut comparer le rythme de la multiplication microbienne pendant ses diverses périodes caractéristiques : cette multiplication semble plus rapide pendant les deux premières heures pour la peptone non dialysée. Quant aux périodes suivantes, on voit que les temps

de génération sont très voisins, ce qui indique une multiplication aussi rapide.

	MICROBES VISIBLES		MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Peptone pepsique dialysée	Peptone pepsique non dialysée	Peptone pepsique dialysée	Peptone pepsique non dialysée
<i>Temps de génération pendant :</i>				
Période dite de latence: 0 h. à 2 h.	102'	53'	1500'	171'
Période de multiplication logarithmique : 2 h. à 7 h. 30	75'	80'	70'	62'
Période de multiplication ralentie : 7 h. 30 à 24 h.	125'	136'	128'	130'
24 h. à 32 h.		1227'		1153'
<i>Heure du maximum...</i>	24 h.	32 h.	24 h.	23 h.
<i>Valeur du maximum..</i>	5.839 millions	7.450 millions	2.833 millions	3.865 millions
<i>Maximum des visibles</i>	2	1,9		
<i>Maximum des résistants.</i>				

Il semble donc que le déclenchement de la poussée soit un peu plus long en milieu dialysé; mais une fois celle-ci établie, le rythme de multiplication devient un peu plus rapide que pour la peptone non dialysée. Le maximum de germes est atteint à 24 heures au lieu de 32 heures, heure de maximum de la peptone non dialysée. Quant au nombre maximum de microbes atteints, il est sensiblement le même pour le milieu dialysé et le milieu non dialysé.

Ceci étant nettement établi, nous avons cherché pour notre part quelle était la valeur bactériologique de notre peptone pep-

sique dialysée pendant 15 jours. Il était, en effet, nécessaire de savoir si une aussi longue dialyse n'avait pas diminué considérablement la valeur de ce milieu de culture.

F) *Valeur bactériologique de la solution de peptone pepsique ayant subi une dialyse de 15 jours et utilisée dans nos essais.*

Pour cette recherche, nous avons suivi la poussée du bacille pyocyanique sur une solution de peptone, solution contenant 20 grammes de peptone par litre.

Dans le tableau suivant, nous donnons les résultats de deux expériences prises parmi plusieurs autres.

AGE DE LA CULTURE	MICROBES VISIBLES		MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	1 ^{re} expérience	2 ^e expérience	1 ^{re} expérience	2 ^e expérience
0	500.000	500.000	346.000	276.000
3 heures	8.295.000	3.918.000	710.000	383.000
6 —	49.770.000	60.076.000	9.030.000	2.650.000
9 —	331.800.000	229.856.000	81.300.000	5.673.000
24 —	3.318.000.000	2.389.980.000	2.060.000.000	2.030.000.000
48 —	5.253.500.000	2.660.000.000	1.430.000.000	1.789.220.000
3 jours	2.101.400.000	1.736.000.000	1.166.000.000	820.000.000
6 —	525.350.000	220.020.000	80.000.000	213.000.000

Nous voyons également ici que ce milieu très dialysé permet encore une très bonne multiplication du bacille pyocyanique. Comme pour les milieux habituels, nous observons la présence des mêmes phases qui caractérisent la multiplication microbienne. La phase de latence n'existe que pour les microbes capables de se reproduire sur milieux gélosés. Le nombre maximum de germes a toujours été atteint à 48 heures pour les microbes visibles et à 24 heures pour les microbes capables de se reproduire sur gélose. Quant à la valeur de ce maximum, il est sensiblement égal au maximum atteint avec une peptone pep-

sique non dialysée. Signalons également que nous avons trouvé des nombres atteignant 9 milliards par cm³.

Voici le détail d'une expérience résumée en un tableau donnant les temps de génération aux diverses périodes :

<i>Temps de génération pendant :</i>	MICROBES VISIBLES	MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE
Période dite de latence :		
0 h. à 3 h.	<i>Pas de période de latence</i>	180'
Période de multiplication logarithmique :		
0 h. à 9 h.	60'	
3 h. à 9 h.		53'
Période de multiplication ralentie :		
9 h. à 24 h.	272'	191'
24 h. à 48 h.	2057'	
<i>Heure de maximum</i>	48 heures	24 heures
<i>Valeur du maximum</i>	5.253 millions	2.060 millions

Nous pouvons donc dire que cette peptone dialysée 15 jours a encore une grande valeur bactériologique. Le rythme de la multiplication y est rapide et le maximum de microbes atteint est semblable aux maxima obtenus dans les milieux non dialysés. Cela confirme les observations de R. DAVID : « Si la richesse « d'une culture augmente avec la quantité de matières organiques « contenues dans le milieu, les deux augmentations sont loin « d'être proportionnelles ». DAVID (104), qui a dosé la quantité de matières nutritives restant après la multiplication microbienne, a constaté également que « la multiplication cesse à un moment où il reste encore dans le liquide de culture de très fortes quantités de matières nutritives ». Comme nous venons de voir qu'après une dialyse de 15 jours, notre milieu très appauvri permet encore

une bonne multiplication des bactéries, nous pouvons dire comme David qu'« il semble que l'arrêt du développement bactérien est produit par un autre facteur que par l'épuisement du milieu ». Les milieux les plus riches en matières protéiques ne sont pas les plus favorables. Il semble aussi qu'il soit inutile d'ajouter toujours de telles quantités de chlorure de sodium aux bouillons de culture; ne venons-nous pas de voir, en effet, que des bouillons qui contiennent de ce sel à la dose de *un centigramme par litre* donnent de très belles cultures de bacilles pyocyaniques? Cela vérifie donc les observations de David concernant la très faible absorption de chlore par ces germes et les observations d'autres auteurs qui concernent la destruction rapide des bactéries dans l'eau salée physiologique.

CONCLUSIONS

De ce que nous venons d'exposer, il paraît difficile de conclure à une différence entre la valeur bactériologique d'une peptone pancréatique et la valeur bactériologique d'une peptone pepsique. Les peptones pancréatiques permettraient un développement plus abondant des « bacilles visibles », et les peptones pepsiques donneraient de meilleurs résultats en ce qui concerne le nombre des germes encore susceptibles de se reproduire sur gélose après un séjour d'une dizaine de jours à 37°. Si on considère ces mêmes milieux dialysés (en exceptant la peptone de muqueuse dont la valeur bactériologique est nettement abaissée par la dialyse), on n'observe pas de grandes différences entre la multiplication du bacille pyocyanique en eau peptonée ordinaire et en eau peptonée dialysée.

En ce qui concerne la peptone pepsique dialysée, que nous avons particulièrement expérimentée, sa valeur bactériologique n'est pas sensiblement diminuée par une dialyse de 15 jours. Elle permet d'obtenir une aussi bonne multiplication microbienne que sur le même milieu non dialysé. Ce milieu, ainsi simplifié et privé de la plus grande partie de ses sels, constituera un excellent milieu de culture pour étudier l'action de tel ou tel élément sur la multiplication microbienne.

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

ÉTUDE DE L'INFLUENCE QU'EXERCENT QUELQUES CATIONS SUR LA MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE

De nombreux auteurs ont déjà signalé combien est différente l'action de certains sels sur la poussée bactérienne et sur le croît de certains champignons, selon la quantité de ces sels mise en jeu. Cette action est, soit antiseptique pour de fortes doses, soit indifférente pour des doses plus petites; elle devient accélérante pour des doses très faibles.

Si la littérature scientifique est riche en observations de ce genre, il nous semble cependant que bien peu d'auteurs ont employé des méthodes de dénombrement précises pour contrôler ces phénomènes (en ce qui concerne les microbes).

C'est pourquoi nous avons voulu suivre ces actions au point de vue quantitatif d'une manière aussi exacte que possible, et les représenter par des courbes.

Les expériences sur les champignons, en particulier sur l'*Aspergillus niger*, et sur l'action fermentative des levures ont été de beaucoup les plus nombreuses. Plus rares ont été les expériences concernant l'action favorisante que peuvent exercer certains cations toxiques sur la multiplication microbienne lorsqu'ils sont employés à des dilutions suffisantes. Pour mesurer cette action, nous verrons que les auteurs ont employé le plus souvent des techniques qui sont plus approchées que précises : variation d'intensité ou apparition plus ou moins rapide d'un pigment, mensuration d'un voile, appréciation d'un trouble, pesée des corps bactériens, estimation en gros du nombre de

colonies ayant poussé sur plaques de gélose par l'emploi de termes vagues : peu, beaucoup, énormément de colonies. Nous n'avons jamais relevé, dans ces expériences, de dénombrements fréquents faits à intervalles bien déterminés. Nous ne sommes pas certain que, dans toutes les expériences dont nous allons parler, les auteurs soient toujours partis d'un même nombre de microbes, nombre déterminé par une numération préalable. En tous cas, il n'est pas d'auteur à notre connaissance qui ait employé deux méthodes de numération conjuguées. Nous verrons que l'emploi parallèle de deux procédés, outre la garantie et la précision qu'il nous donne, nous a permis d'observer des phénomènes que nous n'aurions pu voir en employant seulement une seule de ces techniques.

Ajoutons encore que pour chaque série d'expérience il a été toujours fait une culture-témoin, c'est-à-dire une culture ne contenant pas le cation étudié. De cette façon, nos résultats ont toujours été comparables et nous avons évité ainsi de mal interpréter des variations dues simplement à la nature du microbe ou au milieu employé.

I. — Premières observations. — Travaux fondamentaux

Les travaux de RAULIN (389) en 1869, ont mis pour la première fois en évidence que de faibles doses d'un sel métallique peuvent favoriser le développement d'un champignon. Ce savant, en effet, a pu nettement démontrer que la croissance et la formation du mycélium d'*Aspergillus niger* sont favorisées par la présence de très faibles quantités de zinc. Auparavant, PASTEUR (364), dans ses recherches sur la fermentation alcoolique, avait mis en évidence le rôle important qui incombait aux substances minérales contenues dans les levures. Il avait constitué un milieu de culture ayant la composition suivante :

Eau.....	100
Saccharose	10
Tartrate d'ammoniaque	0,1
Cendres de levure.....	1

et qui assurait un intense développement à la levure, à condition que ces trois sortes de substances fussent présentes. Mais, si on

supprimait les matières minérales représentées ici par les cendres, il n'y avait plus de développement. Voilà donc *le rôle global* des matières minérales mis en évidence.

RAULIN (390) chercha à établir *le rôle particulier* des éléments constituant les cendres; dans ce but il confectionna un milieu, où celles-ci étaient remplacées par des substances minérales définies. Après de nombreuses recherches, il publia une formule, devenue classique, de liquide nutritif permettant le parfait développement de l'*Aspergillus niger*. Au cours de ses premières expériences, Raulin constata que, pour un même milieu de culture, la récolte pouvait varier de 1 à 3. Il observa que ce phénomène provenait de la plus ou moins grande pureté des produits employés pour la préparation du milieu et de la nature des vases dans lesquels on effectuait ces cultures. Les récoltes obtenues étaient d'autant plus considérables que les produits étaient moins purifiés et que les poteries employées étaient plus grossières. C'est à la suite de ces constatations que Raulin fut amené à ajouter à son milieu : le sulfate de fer, le sulfate de zinc et le silicate de potassium en petites quantités. Raulin fit d'ailleurs quelques réserves sur la valeur nutritive du zinc. Il rechercha également si le cuivre pouvait jouer un rôle favorisant; ses expériences ne mirent en évidence que l'action toxique de ce métal.

M. MOLLIARD (336) exposant les travaux de Raulin, dit à ce sujet : « Quant au zinc, qui agit par de très petites quantités sur le rendement, il n'apparaît pas comme absolument indispensable; on peut, en effet, obtenir une récolte encore très notable en n'introduisant pas ce métal dans le milieu de culture; il agit comme un *excitant utile* dont le végétal peut à la rigueur se passer et rentre dans la catégorie des aliments *catalytiques* ou *dias-tasiques*, leur mode d'action étant à rapprocher de celui des ferments solubles; on les qualifie encore, ne préjugant en rien de la manière dont ils interviennent, d'*aliments oligodynamiques*. »

De nombreux auteurs, dont nous aurons l'occasion de parler plus loin, cherchèrent à vérifier les expériences de Raulin et à retrouver cette action favorisante manifestée par certaines substances introduites à doses faibles, en particulier le fer, le zinc et le cuivre.

MOLISH (335) en 1894 et BENECKE (26) en 1895, les premiers, confirmèrent les expériences de Raulin, mais en spécifiant que le

zinc ne devait pas être considéré comme un élément nutritif. A la même époque, un certain nombre d'auteurs signalèrent l'action accélérante produite par d'autres substances. Parmi ceux-ci, LIEBIG (301) en 1870 remarqua que la nicotine, la strychnine en petites quantités, accéléraient l'activité de la levure; POPOFF (376) en 1875 observa que de petites doses de strychnine intensifiaient la formation de méthane dans la fermentation forménique, tandis que de plus grandes quantités de strychnine l'inhibaient.

Plusieurs auteurs observèrent encore des phénomènes analogues : l'action accélérante de faibles quantités d'acide salicylique et d'acide carbonique sur la fermentation (FLECK), l'accélération des fermentations alcoolique et ammoniacale par de petites doses de phénol et de trichlorophénol (DJANIN) (118), (THUMAS et HOFFMANN) (484) etc.

Dans ses travaux sur les antiseptiques, BIERNACKI (39) en 1891, étudiant l'action du bichlorure de mercure sur la fermentation, a remarqué l'existence de doses favorisantes. Nous citerons quelques chiffres particulièrement intéressants fournis par cet auteur :

	Témoin	Cultures contenant 3,3 mil- lionnières de HgCl^2	Rapport	Cultures contenant 6,6 mil- lionnières de HgCl^2	Rapport
Après : 2 h. 30	1,2	4,4	3,7	3,3	2,7
» 3 h. 30	1,8	5,3	3,6	4,3	2,4
» 4 h. 55	3,2	7,9	2,5	5,4	2,1
» 5 h. 30	4,5	9,6	2,1	6,7	1,5
» 29 h. 30	8,8	12,5	1,4	10,8	1,2

H. SCHULTZ (433) en 1888 avait déjà fortement attiré l'attention sur ces phénomènes. Il observa en effet l'action stimulante de différentes substances comme le bichlorure de mercure, l'iode, le brome, l'acide arsénieux, l'acide chromique, le salicylate de soude, l'acide formique, qui accélèrent l'action fermentative de la levure à très faibles doses. Schultz remarqua également qu'il existait des doses où les antiseptiques sont sans action, c'est-à-

dire ni inhibiteurs, ni favorisants. Il avait tiré de ses expériences la théorie suivante : « Chaque excitation exerce sur une cellule isolée ou un complexe de cellules une influence qui provoque soit une diminution, soit une augmentation des capacités physiologiques suivant l'intensité plus forte ou plus faible de l'excitation ». Quelques années avant, ARNDT (9) en 1882 avait obtenu des résultats analogues sur la cellule animale et les avait résumés dans la théorie suivante : « Des excitations faibles stimulent l'activité vitale, des excitations moyennes la favorisent et des excitations fortes la suppriment ». Nous verrons plus loin ce que nous devons penser de ces théories qui ont été réunies sous le nom de loi d'ARNDT-SCHULTZ.

Charles RICHET (404 à 409) en 1892-1893-1902-1915 et A. CHASSEVANT (72) en 1893-1897, ont, à plusieurs reprises, attiré l'attention sur l'action accélérante provoquée par les doses minuscules de certaines substances. D'après ces savants, en allant des doses les plus faibles aux doses les plus fortes, on peut distinguer les quatre séries de doses suivantes :

1^o Les doses indifférentes, qui n'influencent ni la multiplication, ni l'activité biochimique;

2^o Les doses accélérantes ou stimulantes, qui favorisent principalement la multiplication;

3^o Les doses antigénétiques, qui empêchent la fonction de reproduction, mais respectent les autres fonctions;

4^o Les doses antibiotiques qui suppriment toutes les fonctions vitales.

En 1892, après ses premières expériences, Charles RICHET (404) écrit : « A doses plus faibles que la dose ralentissante, les métaux exercent tous (même les plus toxiques) une action accélératrice. Ainsi le sulfate de cuivre et le bichlorure de mercure sont accélérateurs à la dose de 0 gr. 0005 par litre; le perchlorure d'or et le perchlorure de platine à la dose de 0 gr. 005; le perchlorure ferrique à la dose de 0 gr. 5 et le chlorure de magnésium à la dose de 20 grammes. »

En 1902, ce savant écrit encore (406) : « L'accélération de la fermentation lactique par des sels est un phénomène général, même lorsqu'on introduit des quantités presque impondérables de bichlorure de mercure ou de chlorure de cuivre ». Ayant observé une action accélérante provoquée par le chlorure de

magnésium sur la fermentation lactique, il pense que « ce n'est qu'un cas particulier et il rentre dans une loi générale ». Il a trouvé ainsi que la dose favorisante optimum de chlorure de magnésium pour la fermentation lactique est de 12 gr. 5 pour 1.000.

Mais les premiers travaux les plus complets et les plus abondants qui concernent cette question, sont ceux de M. M. JAVILLIER et de MM. G. BERTRAND et M. JAVILLIER sur le zinc et le manganèse.

C'est à M. M. Javillier que l'on doit les premières expériences vraiment rigoureuses sur cette question. Par des essais systématiques, cet auteur a confirmé et étendu les conclusions de RAULIN; il a apporté, de plus, les premières notions précises sur le mécanisme de ces actions favorisantes.

En 1903, H. COUPIN (94) avait publié des travaux effectués apparemment d'une façon plus rigoureuse que ceux de RAULIN, remettant en question les résultats trouvés par ce savant. Il avait conclu notamment « 1° Le fer, le silicium et le zinc ne « sont *d'aucune utilité* dans la nutrition du Stérigmatocystis « nigra; 2° le zinc, même, retarde le développement du mycélium « quand la nourriture est abondante et le tue quand il est mal « nourri ».

Ces résultats contradictoires décidèrent M. Javillier à entreprendre des expériences destinées à trancher la question.

Disons tout de suite que ses résultats ont établi d'une manière définitive que « l'action favorisante du zinc est manifeste » (245-246-247).

Il a tout d'abord spécifié que « si l'on veut observer, d'une « part, la courbe d'accroissement due à l'introduction du zinc, il « faut ajouter au milieu de culture, des doses de zinc *extrêmement* « *petites* (au-dessous de 0 gr. 0001); et d'autre part, pour observer « l'influence nocive d'un excès de ce corps, il faut ajouter au milieu « de culture des doses relativement fortes (au-dessus de 0 gr. 010) « si bien que la Mucédinée nous apparaît, pour les doses extrêmes « très sensible, pour les doses moyennes très indifférente à la « présence du zinc. »

Il constate (246) que « les doses de zinc nécessaires à la plante « sont d'une petitesse insoupçonnée : *un dix millionnième* de zinc « dans le milieu de culture permet à celle-ci d'atteindre son complet développement en 4 jours, et des doses de *un cinquante* « *millionnième*, *un cent millionnième* et moins encore manifestent

« leur présence par un accroissement du poids de matière « vivante ». Même si on prolonge le temps de la culture, en l'absence de ces très petites quantités de zinc, on n'obtient pas les cultures réalisées avec cet élément. M. Javillier observe qu'en présence des très petites quantités nécessaires de zinc, le champignon utilise beaucoup plus complètement les aliments mis à sa disposition : « Il forme un mycélium épais, blanc, feutré « à surface inférieure non visqueuse ; il secrète des diastases plus « actives, il ne montre aucune hâte à se reproduire et il ne forme « ses appareils conidiens qu'après épuisement du milieu ».

Au contraire, privé de zinc, « il développe un mycélium mince, « lisse, à surface inférieure plus ou moins visqueuse, et il forme « ses appareils conidiens extrêmement vite ». Le zinc est donc un élément indispensable et favorisant.

M. JAVILLIER (249) s'est ensuite demandé si le *Stérigmatocystis nigra* *fixait* le zinc. Il en a apporté la démonstration expérimentale et il a recherché et dosé dans quelle mesure avait lieu cette fixation.

Voici les remarques qui lui ont été suggérées par les résultats obtenus :

1° Le *Stérigmatocystis* fixe *tout* le zinc de son milieu de culture lorsque la quantité du métal est égale ou inférieure à 1 milligramme pour 250 cm³ de milieu (dilution $\frac{1}{250.000}$ et au-delà).

2° Le *Stérigmatocystis* fixe *une partie* seulement du zinc de son milieu de culture lorsque la dilution du métal est au-dessous du 250 millième.

3° La valeur du rapport entre le poids de zinc fixé et le poids de zinc fourni à la Mucédinée va en décroissant rapidement.

4° La quantité maxima de zinc que la moisissure puisse fixer, sans être atteinte dans sa vitalité, est voisine de 4 milligrammes et un peu inférieure à ce chiffre (de 3 mgr. 7 à 3 mgr. 9). Le *Stérigmatocystis* est susceptible de fixer sans dommage une quantité de zinc égale au plus à 1/1.100 de son poids.

Selon l'action exercée sur l'*Aspergillus niger* par diverses doses de zinc, M. JAVILLIER les distingue en quatre groupes :

1° Dans le premier groupe entrent des doses extrêmement petites ne dépassant pas le 10 millionnième. Ces doses sont « nécessaires » au développement de la plante.

2° Ce groupe comporte les doses allant du 10 millionième au 250 millième, « doses utiles » sans doute, puisque la mucédinée fixe la totalité du zinc qui lui est offert »; cependant, elles sont supérieures à la dose strictement « nécessaire » qui permet au mycélium d'atteindre son poids maximum.

3° Ce groupe comprend les doses qui vont du 250 millième au 25 millième, l'*Aspergillus* végète normalement mais ne fixe qu'une fraction de zinc; c'est un cas intermédiaire, dans lequel il y a un excès de zinc par rapport aux doses utiles, mais où cet excès est indifférent et pas encore toxique.

4° Commence avec les doses supérieures au 25 millième, en présence desquelles la mucédinée faiblit et n'atteint plus son poids normal; l'effet toxique du zinc se manifeste.

M. Javillier a étendu ses recherches à d'autres Hyphomycètes, à des levures, ainsi qu'à des végétaux supérieurs. Ces expériences ont été faites dans le but de savoir si l'action du zinc sur l'*Aspergillus* était spécifique. En expérimentant l'action de très faibles quantités de zinc sur le *Poecilomyces varioti*, le *Penicillium glaucum*, le *Penicillium caseicolum*, M. JAVILLIER et M^{me} TCHERNOROUTZKY (252 bis) observèrent des faits qui concordent avec ceux qui ont été déjà observés sur le *Stérigmato-cystis nigra*.

En ce qui concerne les levures, M. JAVILLIER (250) a expérimenté avec une « levure-végétal » et une « levure-ferment ». Le zinc ajouté en très petites quantités au milieu de culture de la « levure-végétal » a multiplié les récoltes par 2, 3 et même par 4. « Bien que réagissant au zinc moins vivement que l'*Aspergillus* », l'action de ce métal sur la levure est de même sens que pour la Mucédinée. Quant à la « levure-ferment », c'est l'action du zinc sur la zymase sécrétée qui donnera au phénomène son orientation. « Or, à des doses où le zinc agit énergiquement sur la multiplication de la « levure-végétal », il n'exerce aucune action appréciable sur la fermentation ».

En ce qui concerne l'action de petites quantités de zinc sur les plantes vertes, nous en parlerons un peu plus loin lorsque nous exposerons succinctement les applications de ces expériences à la culture. Disons tout de suite, que pour le blé, l'introduction de faibles doses de zinc (de 1/5.000.000 à 1/250.000), augmente les rendements en poids sec de cette graminée, augmentation qui porte surtout sur la tige et les feuilles.

En 1911, G. BERTRAND et M. JAVILLIER (29 *bis*, 30, 32 *bis*, 35) étudièrent l'influence du manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*. Cette action avait été antérieurement observée déjà par quelques auteurs, dans des expériences qui n'étaient pas à l'abri de toutes critiques.

En 1863, RAULIN (388) avait considéré le manganèse comme un élément « *très utile et presque nécessaire* » au développement de l'*Aspergillus niger*. Après avoir découvert l'action très importante du fer et du zinc, il ne put confirmer ses premiers résultats concernant l'action du manganèse. « Faut-il en conclure, écrit-il, que les sels de manganèse ont agi par les sels de fer ou de zinc qu'ils pouvaient contenir ou bien que le manganèse remplace le fer (ou même le zinc) physiologiquement, comme il le remplace souvent dans les réactions chimiques? » Il ajoute encore : « Je ne saurais me prononcer à cet égard ».

En 1905, GOSSL (193) avait obtenu des augmentations de récolte d'*Aspergillus niger* et de *Penicillium glaucum* en ajoutant au milieu de culture des doses croissantes de sulfate de manganèse. Il subsistait cependant des doutes sur la pureté des sels employés par cet auteur.

C'est pourquoi G. BERTRAND et M. JAVILLIER reprirent ces expériences en employant des milieux d'une pureté aussi rigoureuse que possible. Ces savants mirent nettement en relief l'influence favorable exercée par le manganèse sur le développement de l'*Aspergillus niger*; et ils écrivent à ce sujet (30) : « L'existence d'une « *zone optima* » de concentration, si nette dans le cas du zinc avec l'*Aspergillus*, dans celui du bore avec les Phanérogames, est ici fort imprécise. Les récoltes, qui augmentent d'abord assez vite avec la proportion de manganèse, n'augmentent que de plus en plus lentement lorsque cette dose s'accroît encore. Les récoltes ne diminuent qu'en présence de très grandes quantités de ce métal. »

En ce qui concerne les très petites doses (les plus intéressantes à envisager) l'action favorisante est indiscutable.

Le manganèse employé à des doses moyennes (1/25.000 à 1/1.000) exerce « une action *sensible* sur la formation des conidies autant qu'on en peut juger par la coloration des cultures ».

M. Gabriel BERTRAND (32, 33 *bis*, 34) a repris ces expériences. Il a montré l'extraordinaire sensibilité de l'*Aspergillus niger* vis-à-vis de minuscules quantités de manganèse. Après avoir

préparé une solution nutritive rigoureusement exempte de ce sel, ce savant a remarqué à quel point les récoltes d'*Aspergillus niger* sont peu abondantes. Il suffit d'ajouter à cette solution 0 gr. 0000025 de manganèse pour voir ce champignon se développer très vigoureusement; avec des quantités 10 et même 100 fois plus petites, ce savant a constaté une augmentation de récolte encore très appréciable.

Donc, une proportion extrêmement faible de manganèse, telle qu'un *milliardième* et même un *décimilliardième* (soit une proportion d'un milligramme de métal dans 10.000 litres de liquide nutritif), suffit au développement de l'*Aspergillus niger*.

Comme l'avait déjà fait M. Javillier (248, 249) pour le zinc, G. BERTRAND et M. JAVILLIER (30) recherchèrent dans quelle mesure l'*Aspergillus* fixe le manganèse. Ils trouvèrent que le manganèse est fixé par la plante, mais que les quantités ainsi fixées « sont très éloignées de celles qui sont offertes à la plante » — et ceci même dans le cas des plus petites doses (contrairement au zinc).

G. Bertrand et M. Javillier (30 bis, 31) établirent ensuite une « notion nouvelle » : celle de l'action cumulative des éléments catalytiques. Nous nous bornerons à le signaler simplement ici. Ces auteurs ont, en effet, nettement démontré qu'« on obtient des poids de récolte plus grands par l'addition simultanée de zinc et de manganèse que par l'addition d'un seul de ces métaux ». Ajoutons que le manganèse s'accumule en proportion plus élevée lorsqu'il est associé au zinc et que la présence de ces deux éléments accentue « la fixation globale des éléments minéraux ».

De plus, ces expériences ont apporté des résultats précis en ce qui concerne le mécanisme d'action du zinc; nous en parlerons plus loin. Il est donc indiscutable que « le zinc est utile au développement de l'*Aspergillus niger* » et qu'il manifeste son action favorisante à des doses extrêmement petites (la présence de un dix millionième de zinc dans un certain milieu de culture donne une culture douze fois plus abondante).

Il est même certain que cet élément est « indispensable » (bien qu'il soit très difficile de réaliser des milieux ne contenant pas de zinc du tout; M. JAVILLIER (253 bis) a observé qu'il est des cas où, sans zinc, la plante ne pousse pas du tout : il suffit alors d'ajouter une trace infime de zinc (1/10.000.000 au moins)

pour voir, en peu de temps, s'étaler un mycélium blanc, ondulé, présentant, à peu de chose près, l'aspect habituel ».

M. Javillier (251, 254), a également étudié si cette action si favorisante du zinc vis-à-vis de la culture de l'*Aspergillus niger* pouvait se manifester aussi intensément avec d'autres éléments (en particulier le cadmium, le glucinium, le cuivre, l'uranium, le vanadium).

Dans ce but, il essaie une cinquantaine d'éléments, à des dilutions où le zinc exerce son action maxima (au dix millionnième) et pendant le temps minimum exigé par ce métal, c'est-à-dire 4 jours. Aucun élément n'a fait atteindre à la plante un poids aussi élevé que le zinc. Le cadmium, cependant, a présenté le plus d'analogie avec le zinc, mais, par contre, le glucinium ne s'est pas montré favorisant. Pour M. Javillier, il y a *analogie* entre le cadmium et le zinc, *mais pas identité d'action*. La culture contenant du cadmium atteint son maximum à la concentration : 1/10.000.000, se maintient jusqu'à 1/1.000.000 ; à 1/100.000, elle devient inférieure à la récolte-témoin, pour être complètement inhibée à 1/50.000 ; elle n'atteint jamais le poids obtenu en présence de zinc. La toxicité du cadmium est bien plus grande, la récolte étant déjà très affaiblie à 1/100.000 et inhibée à 1/50.000, alors qu'avec des doses semblables de zinc, les cultures sont encore très belles.

« Par rapport au zinc, le cadmium est donc :

inférieur comme catalyseur — toxique à plus petite dose — inhibiteur plus marqué de la sporulation ».

M. M. Javillier, en prolongeant l'expérience en présence de cadmium finit par avoir des cultures ayant un poids équivalent aux cultures sur zinc âgées de 4 jours : Donc, en ne restant pas dans les mêmes limites de temps que pour le zinc, on peut obtenir avec le cadmium des récoltes de poids égal à celles obtenues en présence de zinc.

D'autre part, en essayant de substituer le glucinium au zinc, M. Javillier voit que, avec les mêmes dilutions et dans les mêmes conditions de temps, on ne peut jamais provoquer une culture équivalente. Même en prolongeant l'expérience ou en faisant deux cultures successives, jamais celles-ci ne deviennent équivalentes aux cultures zincifiées.

Par contre, LEPIERRE (299) a trouvé qu'en prolongeant l'expérience dix jours ou même six jours, on peut obtenir des cultures gluciniées de même poids que les cultures zincifiées. M. JAVILLIER explique ces résultats par le fait que ses milieux de culture sont très purs, alors que ceux employés par Lepierre ne le semblent pas. En effet, il fait remarquer que les cultures-témoins de Lepierre atteignent le poids des cultures zincifiées au bout de quelques jours supplémentaires; dans de telles conditions, il conclut « que n'importe quel élément peut remplacer le zinc, si celui-ci est inutile ». Les cultures-témoins de M. Javillier n'ont toujours permis d'obtenir qu'un faible poids de culture : ceci est dû à la pureté des milieux employés. Les coefficients de multiplication des récoltes atteignent 7,8 et même 10 et 16 (Raulin : 2 à 4,6). Ces coefficients s'augmentent encore lorsqu'on ajoute l'élément favorisant, non à la première culture, mais à la seconde. M. Javillier est arrivé ainsi à un coefficient égal à 50 (Raulin : 10). Ces coefficients sont ceux obtenus en présence de zinc. En présence de cadmium, les chiffres sont bien plus faibles.

En ce qui concerne le cuivre, l'uranium et le vanadium, les expériences de M. JAVILLIER (254) ont mis également en évidence qu'aucun de ces éléments n'est un « catalyseur » aussi puissant que le zinc.

Nous nous bornons ici, à citer les faits; nous exposerons plus loin les hypothèses de ces auteurs concernant l'explication de ces phénomènes.

Nous avons un peu insisté sur ces expériences de G. Bertrand et de M. Javillier ainsi que sur la discussion de M. Javillier (251) et de Ch. Lepierre parce qu'elles constituent des *expériences types*, qui font voir à quel point il faut s'entourer de précautions, lors de la réalisation de telles recherches (emploi de produits très purs, expérimentation de cultures-témoins). Si l'on y manque, on risque de faire des interprétations contraires à la réalité.

Nous allons maintenant signaler les travaux d'un certain nombre d'auteurs concernant l'action favorisante de diverses substances sur la croissance des champignons et des microbes.

La plupart des actions excitantes dont nous allons parler diffèrent de l'action favorisante du zinc et du manganèse, par leur mécanisme d'action. Il semble en effet logique de penser qu'un élément comme le zinc aura un « *mécanisme excitant* » différent

d'un élément comme le mercure ou le plomb : le zinc est un « *excitant physiologique* », alors que le mercure et le plomb sont peut-être « *des excitants toxiques* ».

A ce propos, il convient de rappeler que M. JAVILLIER (253 bis) a défini avec justesse l'action favorisante exercée par le zinc et le manganèse, comme étant « *essentiellement physiologique* ». Ce savant a mis en évidence que la présence de tels éléments dans le milieu de culture a une influence « sur certains actes physiologiques de la plante » tels que la consommation du sucre, l'utilisation de l'azote ammoniacal et la minéralisation de la plante.

De plus, M. Javillier a constaté qu'après avoir obtenu deux cultures successives sur le même milieu, il est devenu impossible à celui-ci d'assurer une troisième culture ; celle-ci devient possible si l'on ajoute 1/5.000.000 de zinc au milieu. Et M. Javillier écrit à ce propos : « Si l'on veut bien remarquer que notre milieu, atténué dans sa valeur alimentaire par de précédentes cultures, est, par suite des sécrétions de celles-ci, devenu plus ou moins toxique vis-à-vis d'un nouveau mycélium, ne vient-on pas à penser que le zinc, qui rend la culture possible, s'est véritablement comporté comme *antitoxique* » ?

Ces arguments obligent donc à refuser l'hypothèse d'une excitation par toxicité en ce qui concerne des « catalyseurs physiologiques » comme le zinc et le manganèse. Mais en ce qui concerne d'autres éléments, comme le mercure et le plomb, on peut accepter, au moins *provisoirement*, que l'action excitante qu'ils manifestent sur certains organismes provient d'une « *réaction à une intoxication* ». Mais c'est une interprétation (ou plutôt un mot) provisoire, en attendant que des expériences plus complètes aient permis de résoudre ce problème comme il a été résolu pour le zinc et le manganèse.

Nous allons donc parler d'un certain nombre d'autres travaux concernant l'action favorisante de diverses substances sur les champignons et les microbes. Nous les citerons dans l'ordre chronologique sans préciser s'il s'agit « *d'excitants physiologiques* » ou « *d'excitants toxiques* ». D'ailleurs, il serait prématuré de faire des considérations de ce genre sur des expériences qui n'ont, généralement, pas été approfondies à cet égard. A notre connaissance, sur un tel sujet, il n'existe que les expériences très complètes de G. BERTRAND et M. JAVILLIER qui permettent de faire de telles déductions.

II. — Autres Travaux

A) CHAMPIGNONS

Bien que les expériences de G. BERTRAND et de M. JAVILLIER sur le manganèse et le zinc suffisent indiscutablement à démontrer l'existence de l'action favorisante que peuvent exercer des doses minuscules de certaines substances sur le développement de l'*Aspergillus niger*, nous signalerons encore toute une série de travaux effectués vers la même époque sur cette Mucédinée.

La plupart de ces travaux se rapportent soit au fer, soit au zinc, soit au cuivre.

La nécessité du fer a été vérifiée par CUGINI (99) en 1876, par SCHULZ (431) en 1876, par LINOSSIER (304) en 1891, par Aso (11) en 1900, qui voient dans le fer une partie constituante des spores, puis par SAUTON (425) en 1910 et surtout par MOLISCH (334) en 1892 qui le considère comme formant partie intégrante du protoplasma des champignons. BENECKE (26) en 1896, KANTER (260) en 1904, G. BERTRAND en 1912 partagent l'avis de MOLISCH. PFEFFER (372) se rallie également à cette opinion : cet auteur attribue deux actions au fer : une action nutritive et une action excitante.

RICHARDS (401) en 1897 a de même observé l'action stimulante du fer et trouvé des résultats conformes à ceux de MOLISCH. Il a constaté une action analogue avec le nickel, le cobalt et le zinc.

En ce qui concerne le zinc, le point de vue de Raulin est resté longtemps inattaqué. Nous avons déjà parlé des travaux de M. Javillier en 1908 qui ont vérifié et étendu les résultats trouvés par Raulin. NAEGELI, PFEFFER, BENECKE et WEHMER ont établi également l'action excitante de ce métal. RICHARDS en 1897, ONO (362) en 1899 considèrent le zinc comme un stimulant typique. RICHTER (410) en 1903, faisant une critique des résultats de Raulin, considère le zinc comme le manganèse, le cobalt et le nickel; il le classe dans les « *stimulants* ». Pour STEINBERG (465) en 1919, le zinc est un élément indispensable à l'*Aspergillus niger*.

En ce qui concerne le cuivre, la plupart des auteurs l'ont considéré comme un élément uniquement toxique. C'est l'avis de NAEGELI (346) en 1893, de STEVENS (468) en 1898, de PAUL et

KRONIG en 1897 et de DRESCHER (123) en 1921. ONO (362) en 1899 observe par contre une action stimulante de cet élément. Les résultats de cet auteur furent confirmés par : VON GUNTHER (202) en 1897, HATTORI et FRED (217) en 1911, alors que RICHTER (410) en 1901, PULST (382) en 1902, IWANOFF (244) en 1904 et KANTER (260) en 1904 ne pouvaient mettre en évidence que l'action toxique de cet élément. WATERMANN (497) en 1912 établit qu'il portait préjudice à la fructification des conidies.

Outre le zinc et le cuivre, ONO en 1902 a mis en évidence que le sublimé pouvait agir comme stimulant.

Cette action exaltante a été enregistrée pour d'autres substances. C'est ainsi que G. THIRY (479) en 1913, faisant un compte rendu sur l'action exaltante de faibles doses d'antiseptiques sur les microorganismes, mentionne : que L. RENARD (399) en 1902 observa l'augmentation de croissance du *Penicillium glaucum* sous l'influence des sels de cuivre; que G. THIRY et COLAS (480) en 1909 remarquèrent une suractivité fonctionnelle de l'*Aspergillus fumigatus* sous l'influence de doses infinitésimales de métaux colloïdaux électriques (doses variables avec chaque métal); que H. STRAUSS (471) signala l'action accélérante de la lactophénine sur le développement de la levure de bière; et que M. E. LATHAM (293) en 1905 obtint la stimulation du *Stérigmatocystis nigra* par l'addition de petites quantités de chloroforme.

Et G. Thiry conclut ainsi : « Une faible quantité d'un antiseptique a une action vivifiante sur les microbes et sur les cellules comparable à celle de certains parasites sur leur hôte, comparable à celle des excitants physiologiques ».

LINOSSIER (305) en 1917 a trouvé que les sels de zinc et de manganèse sont favorables au développement de l'*Oïdium lactis* à faibles concentrations et nuisibles à des concentrations plus fortes.

Il est également intéressant de signaler les expériences de J. EFFRONT (128). Celui-ci a montré qu'une levure poussant dans des dilutions de fluorure de sodium, acquiert une suractivité remarquable.

Pour PRINGSHEIM (380), qui a étudié l'action stimulante du zinc, du nickel, du cobalt et du cuivre, les actions de ces métaux ne sont pas toujours aussi nuisibles qu'on le croit ordinairement et sont fonction de la nourriture : ainsi dans le cas d'une alimentation riche, l'action stimulante se fait pour une plus petite quan-

tité de zinc. BUTKEWITSH et ORLOFF (58) en 1921 observèrent également une action stimulante des sels de zinc, de cobalt et du sublimé.

En 1922, SARTORY et P. BAILLY (424 et 17), dans leur étude concernant l'action de quelques terres rares sur l'*Aspergillus fumigatus*, établissent : 1^o que les sulfates de thorium, de lanthane, d'erbium, d'yttrium, de néodyme, de praséodyme possèdent des propriétés antiseptiques très nettes vis-à-vis des champignons inférieurs, et comparables aux propriétés antiseptiques de ces sels vis-à-vis des microbes, mises en évidence par A. FROUIN et ses élèves. Toutefois, il est nécessaire d'employer des doses plus élevées, ces organismes résistant mieux aux agents antiseptiques que les bactéries. 2^o « qu'à des doses plus faibles, « ces sels possèdent *une action favorisante*; ils donnent aux cultures « poussant dans les milieux qui les contiennent, une végétation « plus abondante, dont le développement est en raison inverse « de la concentration, atteignant un maximum dans les concentrations au 1/5.000 pour les sels de néodyme, d'yttrium, « d'erbium, et au 1/10.000 pour les sels de thorium, de lanthane, « de praséodyme. 3^o Que l'*Aspergillus fumigatus* réagit fortement « contre cette action antiseptique des sulfates de lanthane et de « thorium en donnant des formes de résistance, avec atrophie des « appareils conidiens et une grande diminution de spores. Une « suspension de ces spores est agglutinée très rapidement par le « sulfate de thorium, pour des concentrations de 1/1.000 et « 1/2.000 ».

En 1927, A. NIETHAMMER (355) publie une étude sur : « l'action stimulante des poisons sur les champignons et la loi d'ARNDT-SCHULTZ ».

Afin de voir si ce phénomène d'exaltation est général et si la loi d'Arndt-Schultz est vraie, cet auteur étudie l'action d'un certain nombre de substances sur l'*Aspergillus niger*. Le nitrate d'argent à la dose de 0,0001 %, le nitrate de plomb à 0,0005 %, le sulfate de chrome à 0,0001 et 0,0005 % sont franchement stimulants, alors que ces corps deviennent défavorables à la concentration 0,01 %. D'autres substances comme le sulfate de zinc à 0,005 %, le sulfate de manganèse à des doses allant de 0,001 à 4 %, sont stimulantes, mais seulement dans de bonnes conditions de nutrition : richesse suffisante en sucre par exemple. Enfin, d'autres substances comme le sulfate de cuivre, le sulfate de

nickel, le chlorure de chaux, le phénol ont toujours agi d'une manière toxique. De ses expériences, NIETHAMMER déduit que si, en effet, certaines substances sont favorisantes ou inhibitrices suivant les quantités employées, d'autres substances, par contre, n'ont qu'une influence toxique et défavorable. Et il conclut ainsi :

1^o Quelques substances toxiques ont été examinées pour la première fois du point de vue de leur action excitative sur la croissance de l'*Aspergillus niger*. Ce sont : le sulfate de chrome, le nitrate d'argent, le nitrate de plomb, le formaldéhyde, l'acide salicylique, le thymol.

2^o On a pu démontrer que la même substance toxique peut stimuler de la même façon des processus physiologiques différents.

Etudiant l'influence de la composition du milieu sur la valeur osmotique de la cellule de levure, G. SELIBER et M^{lls} KATZ-NELSON (440) en 1927 ont constaté que des levures habituées au sublimé à la dose de 0,001 % ont une concentration en suc cellulaire bien plus grande que des levures témoins. La détermination de la matière sèche a permis d'établir, comme le montre le tableau ci-dessous, une augmentation de cette matière, pour les levures cultivées dans un milieu contenant du bichlorure de mercure :

Matière sèche des levures.

Levures sans HgCl ²	Levures avec HgCl ²
21 p. 100	26 p. 100
25 p. 100	28,4 p. 100

Intéressantes aussi sont les recherches de H. ROBERG (412) en 1928, au sujet de l'action du fer, du zinc et du cuivre sur le développement de l'*Aspergillus niger*. Raulin considérait le fer et le zinc comme des éléments nécessaires à la croissance des champignons, et le cuivre comme un élément toxique. H. Roberg a voulu vérifier ces faits.

Il a pu confirmer par ses expériences les résultats de JAVILLIER, de STEINBERG (465) en 1918, de BORTELS (44) en 1927 et de A. NIETHAMMER (355), qui avaient eux-mêmes déjà confirmé les résultats trouvés par Raulin, c'est-à-dire que le fer et le zinc sont indispensables au développement de l'*Aspergillus niger* et

en stimulant beaucoup la croissance. Roberg a trouvé comme ONO (362), HATTORI (216), KANTER (260) et BORTELS (44) que le cuivre peut exercer une action stimulante. Il constate, en effet, que ce métal favorise le développement du mycélium et la fructification des conidies de ce champignon. L'addition de cuivre à la culture provoque une coloration noire des conidies, qui, sans ce métal, montrent une teinte jaune ou brune. De plus, Roberg considère que l'action de métaux comme le fer, le zinc et le cuivre est spécifique de ceux-ci et qu'ils ne peuvent être remplacés par d'autres éléments, tels que le bore, l'iode, le cadmium, l'arsenic, le manganèse et l'urane.

F. MARBOE (317) en 1930 a étudié l'influence des métaux sur la levure et a vu que leur action est conforme à la loi biologique d'Arndt. Il a pu mettre en évidence l'existence de doses indifférentes, de doses excitantes et accélérantes de la germination des levures (doses très faibles), de doses inhibitrices et de doses qui provoquent leur destruction.

M^{lle} G. LÉVY (300) en 1932 a étudié l'influence du sulfate d'aluminium sur le développement du *Stérigmatocystis nigra*, pensant que ce corps pourrait peut-être agir à dose infime, comme le sulfate de manganèse. Elle n'a jamais trouvé, pour ce métal, la moindre action favorisante, aussi petites que fussent les doses employées. Le développement reste normal sur des milieux contenant de faibles doses de ce sel (de 0 mgr. 005 à 50 mgr. par litre); celui-ci n'exerce encore aucune action nocive à des doses plus fortes (125 mgr. à 250 mgr. par litre), si ce n'est un retard dans l'apparition des conidies et la formation du mycélium; l'action vraiment nocive n'apparaît que pour des doses supérieures à 250 mgr. par litre. Par contre ZIKES (527), en étudiant l'action de certains métaux sur la fermentation de la levure avait attribué en 1913, à l'aluminium, une action excitante faible. Il est vrai qu'il a expérimenté avec l'aluminium-métal alors que M^{lle} Lévy a utilisé un sel d'aluminium.

Des remarques intéressantes ont été faites par O.-W. RICHARDS (402) en 1933 concernant la stimulation de la croissance de la levure par le thallium, impureté de l'asparagine. Employant dans son milieu de culture diverses marques d'asparagine, l'auteur a constaté que le rendement des levures peut varier de 65 %, les autres conditions demeurant les mêmes. Il a vu alors que cette différence était due au thallium, impureté de certaine

asparagine qui a pu être décelée au spectroscope. En effet, l'asparagine purifiée par recristallisation donne de moins bons résultats. En utilisant une asparagine très pure et en ajoutant 0 mg. 001 de thallium par cm^3 de milieu de culture, il obtient un rendement supérieur de 80 % à la normale. De plus fortes concentrations sont toxiques et de moins fortes concentrations sont insuffisantes. C'est ainsi qu'à 10 milligrammes par cm^3 , la croissance est presque totalement arrêtée.

W. SCHWARTZ et H. STEINHART (436) en 1933 ont entrepris des recherches au sujet de l'action de doses variables de cuivre sur le *Stérigmatocystis nigra*. De ces essais, il ressort que, lorsque ce métal se trouve en très petite quantité dans le milieu nutritif, il joue le rôle d'un aliment indispensable; en quantité un peu plus grande, il se comporte comme une substance excitante qui favorise la croissance, et en concentrations encore plus élevées, il devient une substance inhibitrice et toxique. L'action stimulante a été déterminée pour des doses allant de 0,00001 à 0,000001 % de cuivre. Pendant la croissance le cuivre est véritablement absorbé par le mycélium du champignon, et il y est maintenu soit par capillarité, soit par adsorption, soit par fixation chimique. Les conidies montrent un contenu élevé en cuivre.

HERRLEN HARTMUK (214) en 1933, étudiant l'influence de différents changements expérimentaux sur la rapidité du croît et sur la production du gaz carbonique par les levures, trouve que le sublimé agit comme paralysant à des concentrations de 1/10.000. A la dose de 1/100.000, il remarque, à côté de la paralysie et en même temps que celle-ci, une accélération nette du développement d'autres éléments. Des concentrations encore plus faibles : un millionième et un dix-millionième se montrent extrêmement favorables dans tous les essais et se traduisent par une excitation de la poussée. Celle-ci se manifeste par un raccourcissement du temps de latence du développement cellulaire et par une élévation du pourcentage des cellules qui poussent. Cet auteur a observé également l'influence excitante provoquée par la thyroxine, mais il a trouvé que le fluorure de sodium n'est qu'un paralysant et arrête la fermentation.

Expérimentant l'action de faibles doses de cuivre sur la fermentation alcoolique, R. GUILLEMET (199) en 1934 a abaissé la vitesse de formation de l'alcool, sans que la limite de la fer-

mentation soit changée. Cette décroissance de la vitesse s'accroît de plus en plus, jusqu'à ce que la limite de fermentation soit elle-même abaissée, puis supprimée. Il existe normalement du cuivre dans la levure, au taux de 3 p. 100.000 de levure sèche, (10 gr. de levure contiennent 0 mg. 07 de cuivre). Il n'y a plus de fermentation quand la levure a fixé 1 mg. 3 de cuivre pour 1 gramme de substance sèche. M. Van LAER (1934) fait remarquer que l'influence paralysante du cuivre sur le développement de la levure est plus forte sur une levure vieillie que sur une levure fraîche et n'est pas visible sur une levure accoutumée au cuivre. La rapidité de développement en présence du cuivre dépend également de la race de la levure. La levure de FROBERG nécessite 20 milligrammes pour 1 pour manifester un commencement de paralysie cuivrique, et de 100 à 150 milligrammes de cuivre pour 1 pour être fortement paralysée. Ce qu'il faut remarquer, c'est la grande modalité d'action du cuivre et l'on ne saurait retenir seulement son action paralysante, mais enregistrer, au contraire, sa présence et son action normale dans la levure.

K. PIRSCHLE (374) en 1934, dans ses recherches sur l'action physiologique de nombreux éléments sur l'*Aspergillus niger*, constate, lui aussi, l'existence de métaux stimulants. Chez les alcalins : le rubidium et le césium stimulent d'une façon considérable ; le sodium stimule aussi, mais à haute concentration seulement. Il classe les métaux alcalino-terreux au point de vue toxique dans l'ordre : Bi Mg Ca Sr Ba et parmi ceux-ci le bismuth est le plus stimulant. Parmi les autres métaux, ce sont le zinc et le cadmium qui sont les plus favorisants. Cette stimulation, mesurée par le poids de substance sèche formée, est souvent, mais pas toujours, liée avec l'inhibition ou la diminution de la formation des spores.

A. LASNITZKI et E. SZORENYI (284) ont étudié l'action de différents cations sur les cellules de levures. Ils ont confirmé les résultats de K. Pirschle sur l'*Aspergillus niger*, c'est-à-dire une action favorisante du rubidium, du césium et du sodium. Par contre, ces auteurs ont trouvé que le lithium était très peu favorisant. Dans un autre travail, ils ont observé que les cations alcalins facilitent la fermentation, mais chacun selon des modalités particulières, identiques à celles qui caractérisent leur action sur la multiplication des cellules. Ces auteurs concluent que l'activation de la multiplication est due à une augmentation

de la capacité de fermentation, celle-ci étant directement influencée par la présence des cations alcalins.

Parmi les travaux très récents (1935), signalons ceux de L.-P. GARROD (179) qui a constaté les actions stimulantes du perchlorure de mercure et de l'iode : le perchlorure de mercure à la concentration de 1/500.000 et l'iode dans la proportion de 1/600.000 accélèrent la fermentation de la levure.

B) MICROBES

En 1901, GALLI VALERIO (178), ajoutant de l'oxyde de zinc, dans la proportion de 5 à 10 %, à des cultures de bacille pyocyanique en bouillon, observa une activation de la fonction chromogène, au point qu'elle se manifeste déjà au bout de 15 heures.

En 1909, G. THIRY et COLAS (480) excitèrent la fonction chromogène du bacille pyocyanique par l'addition de petites quantités de lactophénine.

En 1912, AGULHON et SASERAC (4) ont remarqué que les sels d'uranium peuvent avoir une action favorisante sur la formation des acides volatils dans la fermentation alcoolique, de même que sur l'acétification de l'alcool par le *Mycoderma aceti*. Si le milieu contient 1/1.000 d'acétate d'uranium, la production d'acides volatils augmente de 57 %. Ces sels favorisent également le développement de la bactérie du sorbose sur la glycérine. A des concentrations 1/100.000, 1/10.000 et même 1/5.000, on note des augmentations de 16 à 76 %. Ces sels deviennent inhibants à 1/2.000. Agulhon et Sazerac concluent donc que les sels d'urane, à des concentrations allant de 1/500 à 1/100.000, activent les phénomènes d'oxydation dus au ferment acétique et à la bactérie du sorbose. Et ils font la remarque suivante : « Il est néanmoins intéressant de voir un corps dont la présence n'a pas été jusqu'ici signalée dans les milieux naturels, accroître d'une façon considérable certains phénomènes de la vie microbienne. »

Ces auteurs (4 bis) ont également observé que le manganèse avait une influence favorable sur la fermentation acétique.

SAUTON (427) en 1912, étudiant la nutrition minérale du bacille tuberculeux, cherche à déterminer les éléments utiles et indispensables à sa culture. Il note que la présence d'un centi-millième de fer suffit pour tripler le poids de la récolte. C'est pour cette raison que cet auteur attribue au milieu artificiel de

Proskauer et Beck, une action favorable, seulement dans le cas où il renferme à l'état d'impureté le fer, qui ne figure pas dans sa composition.

En 1912, A. FROUIN et Mlle S. LEDEBT (161) publient une première note concernant l'action du vanadate de soude et des terres rares sur le développement du bacille pyocyanique et la production de ses pigments. Ces auteurs concluent que « le vanadate de soude est favorable au développement du bacille pyocyanique et s'oppose à l'apparition du pigment, tandis que les sels de terres rares favorisent l'apparition du pigment s'ils sont employés à petites doses et agissent comme antiseptiques s'ils sont employés à des doses supérieures à 1 gramme par litre. »

La même année, A. Frouin publie une seconde (162) et une troisième note (164), où il expose ses résultats concernant l'action des terres rares et des sels de vanadium sur le bacille tuberculeux et l'*Aspergillus niger*. Considérant que les sels de terres rares se classent parmi les alcalino-terreux, Frouin a cherché si l'on pouvait remplacer la magnésie contenue dans le milieu employé par les sels de terres rares. Il trouve que ceux-ci ne peuvent pas remplacer les sels de magnésium pour la culture du bacille tuberculeux et de l'*Aspergillus niger*. De plus, les sulfates de cérium, de lanthane, de néodyme, de praséodyme, de samarium, à la dose de 0 gr. 005 p. 100 de milieu nutritif « et peut-être à des doses inférieures », favorisent le développement du bacille tuberculeux; à des doses plus élevées, cette action favorisante est beaucoup moins marquée; et à la dose de 0 gr. 1 p. 100, les sulfates de néodyme et de praséodyme empêchent tout développement du bacille tuberculeux. En 1913, A. FROUIN (165) publie une étude sur l'influence des sels d'uranium et de thorium sur le développement du bacille tuberculeux, peu après une communication de P. BECQUEREL (25) concernant le même sujet. Leurs résultats sont contradictoires; à l'encontre de Becquerel, Frouin trouve que les sels d'uranium ne favorisent pas le développement du bacille tuberculeux, mais que les sels de thorium ont une légère action favorisante. Pour Frouin, cette contradiction n'est peut-être qu'apparente, et s'explique parce que les deux auteurs ont utilisé des procédés différents, pour mesurer cette action favorisante : Becquerel mesure simplement la surface du voile et Frouin pèse la quantité de microbes formée.

Cette même année (1913), paraît un mémoire de H. AGULHON et SAZERAC (5) concernant l'action des sels d'uranium et de l'uranium métallique sur le bacille pyocyanique. Ces auteurs formulent les résultats suivants :

« 1^o La dose toxique est le 1/500 avec l'acétate d'urane et le 1/200 avec le nitrate d'urane ;

« 2^o Les doses de ces sels allant du 1/50.000 au 1/1.000 sont « très nettement favorisantes ; si la teneur en pyocyanine est « proportionnelle à la coloration, on peut compter des augmen- « tations de 75 % dans la formation de la matière colorante. « L'augmentation semble aussi porter sur la croissance du « microbe, car avec des doses favorables de sels d'urane, le voile « microbien apparaît plus rapidement et semble plus épais « pendant toute la durée de la culture.

« 3^o Les doses inférieures au 1/50.000 sont légèrement défavorables. »

Les auteurs retrouvent ici ce fléchissement caractéristique de la courbe d'action des sels d'uranium, qu'ils avaient déjà noté pour le *Mycoderma aceti* et le *Bactérium xylinum*. Par ailleurs, ils ont voulu déterminer si cette activation par les sels d'uranium était due à la présence de l'uranium en tant qu'élément chimique ou en tant qu'élément radioactif : Ayant observé une activation, aussi bien dans le cas de sels solubles que dans le cas d'uranium métallique (dans ce dernier cas, la quantité de métal qui passe en solution est infime), ils conclurent plutôt à une action radioactive. Mais, en essayant de le vérifier, ils n'ont pu trouver qu'une action favorisante très faible ; ils considérèrent que cela tient à l'épaisseur des verres employés (ceux-ci devant résister à la stérilisation) qui retiennent ainsi la majeure partie des rayons uraniques A et B.

En 1913, A. FROUIN (163) étudie l'action du sulfate de lanthane sur le développement du *Bacillus subtilis*. Voici ce qu'il dit à ce sujet :

« L'addition de divers sels de terres rares, tels que les sulfates « de cérium, de néodyme, de praséodyme, de thorium, d'yttrium, « aux doses de 0 gr. 5, 1 gramme, 1 gr. 5, n'a aucune action sur « le développement du microbe ; au-dessus des doses de 2 p. 1000., « le développement ne se produit pas. Avec le sulfate de lanthane « ajouté à ce milieu de culture à la dose de 1 gramme ou 1 gr. 50

« par litre, on observe que le *Bacillus subtilis* se développe d'une façon homogène dans le milieu de culture sans donner le voile qui caractérise habituellement ce microbe ; mais, malgré des passages successifs du microbe dans un milieu renfermant du lanthane, le *Bacillus subtilis* reprend ses caractères habituels de culture et se développe en voile, dès qu'on le reporte sur un milieu nutritif ne contenant pas de lanthane. »

Et il conclut ainsi : « L'action du sulfate de lanthane sur le développement du bacille subtilis paraissait intéressante à signaler, parce que cette modification des caractères de culture se produit seulement en présence du sulfate de lanthane et nullement avec les autres sels de terres rares. Il y a donc là une sorte de spécificité, que l'on doit attribuer, dans l'état de pureté où l'on peut obtenir les sels de lanthane, au lanthane lui-même. »

La même année : A. LUMIÈRE et J. CHEVROTIER (313) signalent que des cultures de bacilles tuberculeux sur pommes de terre glycinées sont entravées par les sulfates de lanthane, d'erbium, d'yttrium à des concentrations de 2 p. 1000. Ceci confirme donc certains résultats de Frouin.

En 1914, A. FROUIN et ROUDSKY (167) étudient l'action bactéricide et antitoxique des sels de lanthane et de thorium sur le vibron cholérique et ils constatent que ces sels s'opposent au développement des microorganismes, s'ils sont employés à des doses supérieures à 2 grammes par litre. A des doses inférieures, ces sels de terres rares modifient les propriétés biologiques et les caractères morphologiques des microbes. Ils exercent des actions agglutinantes et précipitantes sur les diverses bactéries en émulsion.

Ces faits ont été confirmés par SIMONINI (451-452) quelques mois plus tard et par P. GIRARD et R. AUDUBERT (186) en 1918 :

Ces derniers auteurs constatent que, en abaissant la charge électrique des bactéries par l'addition d'ions très chargés positivement comme l'ion lanthane, il se produit des phénomènes biologiques différents suivant la dose de sel de lanthane ajoutée : pour des quantités faisant varier la charge de 3,68 à $2,47 \cdot 10^{-6}$ C. G. S., la culture du bacille du charbon est quintuplée, celle du bacille le PREIX-NOCARD est sextuplée et celle du vibron septique est quadruplée ; pour des quantités plus fortes, il y a

survie des cellules et pour des quantités encore plus grandes, ces auteurs constatent un effet antiseptique marqué.

En 1915, paraît une nouvelle étude de A. FROUIN (166) concernant l'action favorisante des sels de terres rares sur le développement du bacille tuberculeux. Citons les termes mêmes de l'auteur : « ... Les sels de terres rares favorisent le développement du bacille tuberculeux et l'action favorisante augmente avec la température de 31°-32° jusqu'à 41°-42°, limites entre lesquelles nous avons fait nos expériences. L'action favorisante est plus grande à la dose de 1/20.000 qu'à 1/4.000. Ces augmentations de rendement aux températures de 36° à 40° sont considérables, puisque le poids du microbe est augmenté de 30 à 200 p. 100. Ces augmentations sont en quelque sorte des minima. Il y a, en effet, une accélération de la culture en présence de terres rares et si l'on compare les cultures faites aux différentes températures avec les témoins, non pas au bout de 35 à 50 jours, mais seulement au bout de 12 à 20 jours, on a des rendements de 20, 50 ou 100 fois ceux des témoins placés dans les mêmes conditions de temps et de température. »

Frouin fit encore d'autres études se rapportant à l'influence des terres rares sur le comportement du bacille tuberculeux. C'est ainsi qu'en 1920 (170), il publie : « Variations des matières grasses du bacille tuberculeux, cultivé sur des milieux définis en présence de terres du groupe cérique », où il indique que les sels de terres rares diminuent surtout au début le taux des graisses et des cires. En 1920 encore, il étudie le développement du bacille tuberculeux (type humain) sur un milieu chimiquement défini en présence de sucres et de terres du groupe cérique. Il note que l'addition de sulfates de terres du groupe cérique à la dose de 1/40.000, 1/80.000 ou 1/100.000 d'oxyde, suivant le métal employé, diminue, dans tous les cas et quel que soit le moment de l'observation, le développement du bacille tuberculeux d'origine humaine. De plus, la culture développée en présence des sulfates de terres cériques ajoutés au milieu à la dose de 1/40.000, réensemencée au bout de 8 jours sur un milieu identique contenant la même dose de sels, ne se développe que très faiblement ou ne se développe pas du tout. Il n'y a donc pas accoutumance du microbe vis-à-vis des terres rares, mais au contraire augmentation très nette de l'action empêchante de celles-ci sur le développement de ce bacille. Dans ce cas, ces

corps, même employés à des doses très faibles, ne favorisent pas la poussée du bacille.

Dans une mise au point de la question des antiseptiques, P. CARNOT (64) en 1918 dit : « Si l'on diminue progressivement « les doses d'antiseptiques ajoutées aux cultures (ou parfois leur « temps d'action), on peut assister à un phénomène paradoxal, « consistant en ce que les cultures microbiennes reçoivent, au « contraire, une stimulation par de petites doses d'antiseptiques, « poussent mieux, exaltent leurs fonctions, leurs propriétés « fermentatives ou leur virulence. C'est le *phénomène inverse* qui « se rencontre pour un si grand nombre d'actions physiologiques « médicamenteuses ou toxiques. De même qu'un anesthésique « où un déprimeur à petite dose ou au début de son action devient « un excitant (qu'il s'agisse de chloroforme, d'éther, de morphine), « de même à faibles doses ou pendant un temps réduit, l'antiseptique peut exercer une stimulation de la vie, de l'activité fonctionnelle ou de la reproduction microbienne ».

Ces actions favorisantes se dégagent aussi de l'intéressante expérience de P. CARNOT et J. DUMONT (65). Des boîtes de Pétri, dans lesquelles on a coulé de la gélose fondue etensemencée de staphylocoque, contiennent en leur centre des godets présentant des dentelures peu élevées, par lesquelles se fait la diffusion des antiseptiques que l'on veut étudier. Parmi ceux-ci, les auteurs ont employé une solution de sublimé à 1/2.000. Après un séjour suffisant à l'étuve, on remarque autour du godet central une zone claire et sans microbes. Cette zone sera plus ou moins large suivant la valeur de l'antiseptique et pourra même lui servir de mesure. Le reste de la plaque est couvert de fines colonies et, phénomène remarquable, l'aréole amicrobienne est entourée d'une couronne de colonies plus grosses, plus exubérantes, plus chromogènes, beaucoup plus développées que celles du reste de la plaque. Cela est dû à ce que ces colonies ont subi l'influence favorisante de petites quantités de la substance antiseptique.

Et P. CARNOT ajoute : « De même, on peut observer une exaltation de virulence du fait de substances empêchantes contre lesquelles le microbe réagit. Il est probable que l'exaltation obtenue par passages successifs dans le corps de certains animaux est due à une réaction de même ordre contre les substances empêchantes qui s'y trouvent ».

En 1923, paraît une contribution de A. FROUIN et M^{lle} GUILLAUME (171), sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux et l'action favorisante ou empêchante des sels de terres rares et des sels de fer. Ce travail explique la contradiction de certains des résultats obtenus antérieurement par Frouin : en effet, dans ses premiers travaux de 1912 à 1915, il avait trouvé que les sels de terres rares ont une action favorisante sur le développement et augmentent le rendement du bacille tuberculeux, tandis que les résultats publiés en 1920 l'amènent à une conclusion inverse. Ceci semble provenir des conditions d'expérience : le rendement est augmenté lorsque la culture se développe dans des milieux synthétiques, glycinés, sucrés et neutralisés ($\text{pH} = 6,2$ à 7); il est diminué lorsque la culture se multiplie dans les mêmes milieux non neutralisés ($\text{pH} = 5,2$ à $3,6$). Dans les milieux non glycinés, mais simplement glucosés, l'action des sels de terres rares varie avec la concentration du sucre et la réaction du milieu. A la suite d'autres expériences, les mêmes auteurs signalent que l'addition de sels de fer à la dose de $1/100.000$ double ou triple la récolte du bacille tuberculeux. Ils pensent que ceci provient d'une meilleure utilisation de la glycérine.

En 1924, A. FROUIN (172) publie un important mémoire sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. Il y confirme ses résultats précédents, à savoir que :

1^o Les terres rares en milieu neutre favorisent la rapidité du développement et augmentent le rendement en poids de la culture.

2^o Dans le même milieu non neutralisé ($\text{pH} : 5,7$), il y a diminution des cultures (exception faite pour l'yttrium).

3^o Dans les milieux acide-glyciné-lactosé, les sels de thorium et d'erbium augmentent le rendement et les sels d'yttrium n'ont aucune action.

4^o Dans les milieux sans glycérine et simplement glucosés, il y a action différente, suivant que la réaction est acide ($\text{pH} = 5,7$) ou alcaline ($\text{pH} = 6,9$).

Et la conclusion de Frouin concernant l'action des terres rares est celle-ci : « Les sels de terres rares des groupes cérique et yttrique, en milieu glyciné, favorisent le développement en réaction alcaline ($\text{pH} = 7,2$) et diminuent le rendement en milieu acide ($\text{pH} = 5,8$) ».

Outre le bacille pyocyanique et le bacille tuberculeux, A. Frouin a étudié l'action des terres rares sur d'autres microbes. Avec A. MOUSSALI (169 et 340), il expérimente l'action de ces sels sur le bacille dysentérique. Selon les doses utilisées il observe :

1° Une action antiseptique : Les sulfates d'erbium, de lanthane, d'yttrium, agglutinent complètement les bacilles du type Flexner à la dose de 1/10.000 en 2 heures et à la dose de 1/20.000 en 24 heures. Le sulfate de thorium est moins actif, il agglutine à la dose de 1/5.000 en 2 heures et 1/10.000 en 24 heures.

2° Une action microbicide : Le sulfate de thorium possède un pouvoir bactéricide très net et plus fort que les sulfates d'erbium, d'yttrium et de lanthane placés dans l'ordre décroissant

3° Une action antivirulente : Le sulfate de lanthane possède une action antivirulente plus grande que les sulfates d'erbium et d'yttrium. Le traitement d'émulsions microbiennes par le sulfate de thorium ou le sulfate de lanthane les rend moins virulentes et permet une immunisation plus rapide des animaux.

Des travaux de EISENBERG (135) en 1918, de HOLLAND (237) en 1922, de M^{lle} HOTCHKISS (241) en 1923, il ressort que des sels toxiques, tels que ceux de plomb et de mercure, peuvent aussi être stimulants, lorsqu'ils sont employés à des dilutions suffisamment grandes. Le sodium, le plus favorable de tous les cations, est toxique en concentration suffisamment élevée. Holland a étudié l'action du potassium et du magnésium et M^{lle} Hotchkiss a expérimenté le sodium, le potassium, le calcium, le magnésium, le baryum, le plomb, le mercure, tous sous forme de chlorures. Ces auteurs et particulièrement M^{lle} Hotchkiss, ont établi les concentrations stimulantes, légèrement toxiques et très toxiques, de ces sept sels. Ainsi pour le plomb, ce dernier auteur trouve une concentration stimulante pour une quantité de 0,00005 molécule et, pour le bichlorure de mercure, une concentration stimulante pour 0,000001 de molécule.

RUHLAND (418) en 1924 a expérimenté l'action du fer sur les bactéries et a constaté que, sans cet élément, il n'y a pas de croissance. GROHMANN (196), WARBURG (496) en 1921 ont également conclu au caractère indispensable de sa présence.

MADSEN et NYMAN (315) ont étudié l'action du cuivre et du manganèse et ont conclu à son action stimulante sur la croissance du bacille tuberculeux.

C. E. WINSLOW et A. F. DOLLOFF (510) en 1928 ont confirmé les expériences de HOLLAND (237), de HOTCHKISS (241), de WINSLOW et FALK (511) et en général des autres expérimentateurs antérieurs. D'après eux, les cations paraissent stimuler la croissance des bactéries, lorsqu'ils sont employés à certaines concentrations et l'empêcher à des concentrations plus élevées. Ces divers auteurs ont vu aussi que les concentrations toxiques et stimulantes varient beaucoup avec les différents sels. Ils ont étudié l'action du sodium, du potassium, du calcium, du magnésium, du baryum, du plomb et du mercure (ce sont les sept sels étudiés par Hotchkiss). C'est ainsi que pour des métaux toxiques, comme le plomb et le mercure, ils ont mis en évidence l'existence de concentrations stimulantes égales à : 0,0000001 de molécule pour le plomb et à 0,00000001 de molécule pour le mercure, les doses toxiques étant 0,0005 de molécule pour le plomb, et 0,0000005 de molécule pour le mercure.

Nous signalerons que WINSLOW et HOTCHKISS (507) avaient déjà trouvé antérieurement (en 1922) des résultats semblables. Parmi les 23 sels étudiés, ils ont observé pour 15 d'entre eux une concentration provoquant une poussée du bacille coli, plus rapide que celle qui se produit dans la solution peptonée simple. L'intérêt de cette découverte s'accroît quand on considère que, en plus du potassium, du sodium, de l'ammonium, du lithium, du strontium, du magnésium, du calcium et du baryum, ils ont trouvé des concentrations stimulantes pour des sels ordinairement toxiques, tels que le titane, l'étain, le nickel, le plomb, le cérium et même le mercure. Ces auteurs considèrent en outre, qu'une étude plus complète aurait vraisemblablement abouti à démontrer l'existence de concentrations stimulantes pour les huit autres sels.

YASUDA MORIO (522) en 1929 considère qu'une faible quantité de sels alcalins agit comme un stimulant de l'activité bactérienne (dans la décomposition de l'amidon par exemple), et que les cations polyvalents agissent de la même façon, mais à des dilutions bien plus fortes. Il pense que la véritable action des sels polyvalents paraît être leur pouvoir de transporter l'oxygène nécessaire aux bactéries.

Etudiant l'action de solutions très diluées de certains alcaloïdes : quinine, strychnine, aconitine, solanine, sur le *Paramecium caudatum*, M. FEILER (153) en 1930 a remarqué pour

certaines dilutions une extraordinaire stimulation des paramécies. Il obtient même une courbe comportant deux maxima. Ceux-ci traduisent chacun une stimulation qui correspond à une zone de dilution déterminée. Entre ces deux dilutions stimulantes, les doses intermédiaires produisent une diminution de l'activité; pour des concentrations plus fortes, Feiler constate une diminution brusque de la courbe. Voulant expliquer l'existence de ces deux maxima, il publie en 1931 de nouveaux travaux, dans lesquels il cherche à vérifier l'hypothèse suivante : l'un des deux sommets serait dû à une stimulation directe des paramécies, alors que l'autre indiquerait une augmentation du nombre des bactéries du milieu ambiant, c'est-à-dire une augmentation de la quantité d'aliments, dont se nourrissent ces infusoires. C'est donc dans ce but qu'il a étudié l'action de diverses dilutions de quinine sur la rapidité de multiplication des bactéries. Il expérimente avec le *Bacillus subtilis*, le *Bacillus proteus*, et le mélange habituel de microbes servant de nourriture aux paramécies. Les résultats constatés sont concordants pour toutes ces bactéries. A partir d'une certaine concentration, il s'exerce une action stimulante de l'alkaloïde. De part et d'autre de cette zone de dilutions favorables, il y a régression. Cette action est donc représentée par une courbe, comportant un seul maxima formant plateau. Feiler ne retrouve pas le second maximum; il conclut donc, dans ce cas, à une stimulation spécifique directe sur les paramécies, tandis que le premier maximum provient d'une stimulation, soit de la flore bactérienne servant d'aliment aux paramécies, soit d'une forme bactérienne particulièrement importante pour leur alimentation.

Cet exemple, nous a semblé particulièrement intéressant à signaler, car il montre une véritable dualité d'actions favorisantes : action favorisante, d'une part sur un organisme et d'autre part sur ses aliments constitués ici par des bactéries.

O. BAUDISCH (20) en 1932 a observé que les oxydes et les hydrates d'oxydes de fer sont actifs sur la croissance des bactéries. Ces corps peuvent même remplacer le sang dans certains milieux de culture.

En 1933, URBAIN et GORET (489) ont étudié l'action de sels de terres rares sur le développement du *Brucelle abortus*. Ils ont expérimenté avec les sulfates de cérium, de lanthane, de samarium, de néodyme, de praséodyme, qu'ils ajoutaient à du bouillon

Martin, dans les proportions de 0 gr. 005, 0 gr. 01, 0 gr. 1, 1 gr. 2 gr. et 3 gr. pour 1000. Ces chercheurs ont constaté qu'à la dose de 1 gr. ou 2 gr. pour 1000, ces sels n'ont aucune action empêchante sur le développement du *Brucella abortus*; ils ont, au contraire, une action favorisante remarquable et les deux auteurs préconisent l'emploi de ces sels dans les cultures de *Brucella*, qui sont parfois lentes à se développer. A 3 gr. pour 1000, les mêmes sels s'opposent au développement de ces germes. Ces résultats confirment les résultats de A. FROUIN et de ses élèves, dont nous avons parlé plus haut.

Etudiant la désinfection de l'eau au moyen des sels d'argent solubles, S. A. DMITRIJEW (119) en 1933 mit en évidence l'existence de quelques bactéries qui sont moins sensibles à l'action du nitrate d'argent. Quelques-unes de celles-ci montrent même une multiplication accélérée. Voici donc encore une manifestation de l'action excitante des sels à des doses très petites.

En 1934, W. CETTEL (360), devant l'insuffisance des essais conduits jusqu'à ce jour sur l'action excitante, remarquée depuis longtemps, des substances antiseptiques sur le développement des bactéries, fait une série de recherches avec le liquide argentin qui contenait, lié au chlore, de l'argent sous forme colloïdale. Il expérimente avec le bacille coli et le staphylocoque et il constate : une action désinfectante avec destruction en 24 heures pour une concentration de 1/100.000; une paralysie à laquelle succède une excitation de la multiplication pour les concentrations de 1/200.000 et de 1/500.000; pour des concentrations plus faibles allant de 1/2 million à 1/2 billion, l'action est très favorisante; celle-ci est la plus marquée pour les concentrations allant de 1/300 millions à 1/3 milliards. A ces concentrations, il obtient, en effet, une augmentation de 100 % pour un intervalle de deux heures, par comparaison avec une culture témoin sans sel d'argent. L'auteur remarque qu'à chaque excitation succède une paralysie et, d'après lui, la conception habituelle, qui connaît seulement la paralysie *ou* l'excitation du développement par les substances chimiques, semble donc erronée. A chaque paralysie qui ne conduit pas à une complète destruction, fait suite une excitation, à laquelle succède une nouvelle paralysie. Ce phénomène a lieu non seulement pour les antiseptiques étudiés, mais encore pour les substances nutritives habituelles qui agissent naturellement comme des substances paralysantes ou excitantes,

de telle sorte qu'on peut parler d'une *périodicité du développement*.

Les mêmes phénomènes ont été observés pour la formaldéhyde.

En 1934 également, P. MARTIN (319) publie un mémoire concernant l'action *in vitro* de certains sels d'or sur le bacille de Koch cultivé en milieu liquide. Il étudie l'action de la crisalbine et de l'allochrysine.

Pour l'allochrysine, il ne retrouve pas les résultats de P. COURMONT, H. GARDÈRE et P. PICHET. Ces auteurs trouvaient, en effet, que : pour des concentrations allant de 1/10.000 à 1/50.000, il y avait une action empêchante et bactéricide complète ; pour des concentrations allant de 1/500 à 1/2.500, *il y avait une action favorisante* ; à des doses inférieures : 1/50.000, il y avait diminution du développement, c'est-à-dire une action empêchante et celle-ci disparaissait complètement pour des doses allant de 1/1.000.000 à 1/5.000.000. Cette action favorisante pour des concentrations allant de 1/500 à 1/2.500, qui constituerait un phénomène très intéressant, n'a pas été retrouvée par P. MARTIN. Cet auteur a simplement constaté que l'allochrysine possède une action nulle pour des taux allant de 1 p. 500 à 1 p. 100.000. Quant à la crisalbine, il obtient une inhibition des cultures pour des concentrations allant de 1 p. 20 à 1 p. 10.000. Ce pouvoir inhibiteur s'atténue et disparaît à des concentrations plus faibles. Il n'observe donc pas de doses favorisantes pour ces deux composés.

Philip L. CARPENTER, Mac Donald FULTON et C. A. STUART (66) ont expérimenté l'action favorisante d'un composé du germanium, le méthylxyde de germanium, sur le développement de différents microbes : *Bacillus coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Eberthella typhosa*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus aureus* et *Staphylococcus albus*. Au contact de 0,01 molécule de ce composé, il se manifeste d'abord une faible paralysie dans le développement de ces microbes ; à cette paralysie succèdent d'abord une forte stimulation située entre la 2^e et la 20^e heure et ensuite une nouvelle paralysie du développement. Les courbes de développement établies à partir d'une telle expérience donneront une image exacte de l'effet de ce sel, mais si les observations sont effectuées seulement pendant un temps déterminé du développement, elles seront insuffisantes pour concevoir l'allure de ces phénomènes. Si l'on compare les courbes de croissance sur milieu avec germa-

nium à celles des cultures-témoins, on constate que la stimulation due à 0,01 molécule de méthyl-oxyde de germanium s'élève à des valeurs variant de 40 à 100 %.

Tout récemment, A. ZLATAROFF et D. KALTSCHewa (528) en 1936, étudiant l'influence des sels de manganèse, de fer, de nickel, de cobalt, sur la fermentation lactique, ont montré que ces cations exercent sur le *Streptococcus lactis* tiré du Yoghourt une action qui dépend de leur concentration. Jusqu'à un taux déterminé, ces sels ont une influence paralysante ; lorsque celui-ci diminue, l'influence paralysante diminue également peu à peu pour se transformer en une influence excitante et disparaître quand la concentration des sels devient trop faible.

Bien que la plupart des recherches concernant l'existence de ces actions favorisantes aient été effectuées sur des végétaux inférieurs comme certains champignons et certains microbes, nous pensons qu'il est intéressant de mentionner quelques-unes des expériences qui ont été tentées sur les végétaux supérieurs. Elles montrent le grand intérêt économique que présentent de tels essais. Elles illustrent la portée considérable que peut avoir une expérimentation rigoureuse qui, mise au point et étudiée sur des végétaux inférieurs, est ensuite appliquée à l'agriculture.

C) EXPÉRIENCES RÉALISÉES SUR LES VÉGÉTAUX SUPÉRIEURS

Dès 1905, G. BERTRAND (28 bis-29) à la suite de ses recherches sur la constitution chimique de la laccase, qui ont démontré « l'importance physiologique du manganèse » et la nécessité de sa présence pour le fonctionnement de la cellule vivante, a été « conduit logiquement à essayer les combinaisons du manganèse comme engrais ». Il a étudié notamment l'influence du sulfate de manganèse sur la culture de l'avoine. En ajoutant ce sel aux engrais, ce savant a observé une augmentation du rendement allant de 22,5 % à 40 %. Ces expériences ont ouvert la voie à d'autres études. On a essayé d'utiliser d'autres substances, comme « engrais catalytiques » : M. JAVILLIER a expérimenté le zinc, AGULHON : le bore, STOKLASA : l'aluminium.

M. JAVILLIER (249 bis) a observé que l'introduction de doses faibles de zinc (de 1/5.000.000 à 1/250.000) augmente les rendements en poids sec du blé.

AGULHON (3) a noté que l'addition de bore, sous forme d'acide

borique, à des cultures de maïs provoquait une augmentation de poids sec de 39 à 50 %.

STOKLASA (470) a pu conclure que le sulfate d'aluminium agissait favorablement sur la culture des betteraves; il a enregistré une augmentation de 300 à 1.800 kilogrammes à l'hectare. Cet auteur a obtenu des résultats plus intéressants encore en ajoutant à la fois du manganèse et de l'aluminium.

En outre, STOKLASA (469) en 1913 a étudié l'influence du nitrate d'uranium sur la végétation du *Melilotus albus* et celle du nitrate de plomb sur la culture de l'*Avena sativa* et du *Polygonum fagopyrum*. Ajoutant 0 gr. 105 de nitrate d'urane pour 65 kilogrammes de terre, il obtient un rendement excédant de 24 % le témoin. Par ailleurs, ajoutant 0 gr. 00852 de nitrate de plomb pour la même quantité de terre, il obtient un rendement supérieur de 115 % pour les fruits et de 35 % pour la paille, dans le cas de l'*Avena sativa*; une addition de 0 gr. 014 de nitrate de plomb pour les 65 kilogrammes de terre donnera un excédent de 58 % pour les fruits et de 16 % pour la paille, en ce qui concerne le *Polygonum fagopyrum*. De plus, il constate que si l'on augmente les doses de ces sels, notamment celles de nitrate de plomb, l'action devient nuisible.

NIETHAMMER (356) en 1931, étudiant l'action de certains composés de métaux lourds sur la cellule végétale, observe que le cyanure de nickel et de potassium n'est pas toxique à des concentrations inférieures à 0 gr. 125. Le nitrate de nickel est moins toxique encore. Par contre, le nitrate de mercure est très toxique.

D'après BRAMBRING (45), il en est de même pour le nitrate d'aluminium.

HILDEBRANDT et BOYCE (233) en 1931 remarquent également que de faibles quantités de sels de manganèse et de cuivre peuvent stimuler la poussée des *plantes* et des champignons. Ces auteurs font la même remarque au sujet des cyanures de potassium et de sodium.

A. RADOEFF (386) en 1932 observe que la croissance du riz est stimulée après un séjour des graines de 34 heures et à 27°, dans des solutions de sulfate de manganèse. Les sels d'uranium ont une action excitante encore bien plus forte. Le même auteur constate que tous les colorants vitaux stimulent, eux aussi, le développement, et il confirme les résultats de POPOFF (377) concernant l'action stimulante de l'hydroquinone et de divers polyphénols.

BOHN et DRZEWINA en 1932 (41) ont observé que l'argent métallique n'est pas toujours nocif, mais qu'il peut favoriser la croissance et la différenciation. C'est ainsi qu'ils ont remarqué un « allongement démesuré » de la racine de cresson alénois, un développement rapide des cotylédons et une « différenciation précoce » des poils sécréteurs de tabac lorsque ces plantules se développent au contact d'une mince feuille d'argent. Ces auteurs n'ont rien observé de semblable avec l'étain et l'aluminium.

Il convient encore de citer quelques observations concernant l'action stimulante de faibles quantités de certains sels sur la germination des graines. Parmi les auteurs ayant étudié cette question : BOKORNY (42) a observé l'action stimulante du sulfate de cuivre à 0,0025 % sur l'orge ; A. BECKER (24) a noté également une action favorable de ce sel en solution à 0,05 % sur les graines de blé ; VARVARO (491) a constaté l'influence favorisante du bioxyde de manganèse sur le développement de certaines semences ; HEUBNER (230) a attiré l'attention sur l'action stimulante de petites doses de certains sels de mercure sur le développement du blé et de l'avoine ; GRUNFELD (198) a remarqué l'influence favorable exercée par certains désinfectants sur la germination des graines. De même, NOELDECHEN (357) constate l'action stimulante sur la germination de l'orge : du sulfate de cuivre, du nitrate de plomb et du sulfate de zinc, lorsqu'ils sont utilisés à des dilutions suffisantes. Des observations sur la possibilité de stimulation de la germination des graines ont été également publiées par A. NIETHAMMER (354) en 1926.

Nous venons d'exposer un certain nombre de travaux mettant en évidence ce fait que certains sels toxiques employés à des doses suffisamment faibles peuvent exalter et favoriser la croissance et la multiplication de certains végétaux. ARNDT et SCHULZ, à la suite de leurs expériences, le premier sur des cellules animales, le second sur des levures, ont proposé une théorie générale concernant ces phénomènes, connue sous le nom de *loi d'Arndt-Schulz* et dont nous allons parler maintenant.

III. — Loi d'ARNDT-SCHULZ.

En 1882, ARNDT (9) expérimentant sur la cellule animale, a résumé les résultats de ses recherches dans la théorie suivante : « Des excitations faibles stimulent l'activité vitale, des excita-

tions moyennes la favorisent, des excitations fortes la suppriment ».

Mais c'est surtout H. SCHULZ (433) qui attira l'attention sur ces phénomènes. Déjà en 1877 (432), dans son étude « Zur Lehre von der Arzneiwirkung », il écrivait : « Jeder Reiz auf eine einzelne Zelle sowohl, wie auch auf die aus Zellgruppen bestehenden Organe entweder eine Vermehrung oder eine Verminderung ihrer physiologischen Leistungen bedinge, entsprechend der geringeren oder grösseren Intensität des Reizes », ce que nous pouvons traduire : « Chaque excitation, aussi bien sur une cellule isolée que sur l'ensemble de cellules composant un organe, provoque soit une augmentation, soit une diminution de leur travail physiologique, l'une ou l'autre étant proportionnée à la plus faible ou à la plus forte intensité de l'excitation ».

En 1888, SCHULZ publie ses expériences concernant l'action du bichlorure de mercure, de l'iode, du brome, de l'acide arsénieux, de l'acide chromique, du salicylate de soude et de l'acide formique sur la fermentation de la levure. Il constate que ces substances accélèrent la fermentation lorsqu'elles sont ajoutées en très faibles doses. Il trouve que les concentrations provoquant les stimulations optima sont de : 1/500.000 à 1/700.000 pour le sublimé, 1/600.000 pour l'iode, 1/300.000 pour le brome, 1/40.000 pour l'acide arsénieux, 1/8.000 pour l'acide chromique, 1/2.000 pour la salicylate de soude, 1/10.000 et 1/30.000 pour l'acide formique. Il remarque en outre, notamment pour le sublimé, l'iode et l'acide chromique, aux dilutions les plus favorisantes, qu'une fois que le maximum est atteint, il y succède un ralentissement accentué du travail fermentaire. De plus, en ce qui concerne l'acide chromique et le salicylate de soude, cette excitation n'a lieu que pendant les premières heures. Et Schulz conclut : « Jeder Reiz auf jegliche lebende Zelle eine Wirkung ausübt, deren Effect hinsichtlich der Zellenthätigkeit umgekehrt proportional ist der Intensität des Reizes », ce que nous traduirons : « Chaque excitation, sur chaque cellule vivante, exerce une action, dont l'effet à l'égard de l'activité de la cellule est inversement proportionnel à l'intensité de l'excitation ». Schulz a assimilé ces phénomènes à ceux que CLAUDE BERNARD avait observés avec les poisons de l'organisme, qui commencent à exciter avant de paralyser (alcool, éther, curare).

C'est la réunion des théories d'ARNDT et de SCHULZ, théories

déduites de leurs expériences, qu'on appelle : *loi d'Arndt-Schulz*.

Cette loi est-elle acceptable? A-t-elle bien droit au nom de loi? Existe-t-il des exceptions?

En 1896, F. HUEPPE (242) formule cette loi de la façon suivante : « Chaque corps qui détruit, en concentrations déterminées, le protoplasme, supprime en quantités plus faibles sa capacité d'évolution; mais, en quantité encore plus faible, c'est-à-dire de l'autre côté du point de l'indifférence, ce corps agit comme excitant et stimule la vitalité. »

Puis divers auteurs tentent de la vérifier. En 1917, JOACHIMOGLU (258) ne peut confirmer la règle de Schulz que pour certains poisons. Pour cette raison, il pense qu'il faut lui refuser le nom de loi. C'est également l'avis de K. SUPFLE (472), qui va jusqu'à la considérer comme une « formule vide ».

K. FRICK et R. KRUGER (159) en 1924 ont fait la critique de la théorie de Schulz et, après expériences, ont refusé de l'admettre. En 1926, ZELLER (525) et R. MEIER (320) ont contrôlé à leur tour les expériences de Schulz : ils ont relevé des fautes graves dans sa technique et mis en doute ses résultats. HEUBNER (234) en 1926 prend une position intermédiaire : cet auteur considère qu'il est aussi impossible de nier toute action excitative que de la conférer à toutes les substances. D'ailleurs, il sépare les substances qui sont considérées comme excitants du métabolisme des cellules normales, des substances qui exaltent les processus de division cellulaire. Rien ne prouve jusqu'à présent l'existence des premières, tandis que la stimulation des processus de division cellulaire a été bien démontrée. A. NIETHAMMER (355) a cherché également à vérifier la loi d'Arndt-Schulz en expérimentant l'action excitative de quelques substances toxiques sur la croissance de l'*Aspergillus niger* : le nitrate d'argent, le nitrate de plomb, le sulfate de nickel, le sulfate de chrome, le sulfate de zinc, le sulfate de manganèse, le sélénium, l'acide salicylique, le formaldéhyde, le thymol et le phénol. On peut diviser en 3 catégories les phénomènes observés par Niethammer :

1^o Certaines substances : le nitrate d'argent, le nitrate de plomb, le sulfate de chrome, possèdent une action excitante quand ils sont en faible quantité et une influence inhibitrice lorsqu'ils sont en plus grande quantité. Ces corps agissent donc conformément à la loi d'Arndt-Schulz.

2° D'autres substances peuvent avoir une action excitante, mais seulement dans certaines conditions : par exemple dans le cas d'une bonne nutrition ; sinon, elles agissent uniquement d'une façon toxique : ce sont le sulfate de zinc et le sulfate de manganèse.

3° Enfin il y a des substances qui ne sont que toxiques et qui n'ont jamais montré d'action stimulante ; ce sont le phénol, le sulfate de cuivre, le sulfate de nickel, et le chlorure de chaux.

Voilà donc assez d'exceptions pour qu'on estime prématuré le terme de « loi générale » et Niethammer refuse énergiquement d'approuver cette théorie d'après laquelle « chaque poison a une dilution propre à laquelle il agit comme stimulant ».

Niethammer, considérant également l'action excitante qu'ont certains poisons vis-à-vis de la germination des graines, n'a jamais retrouvé cette action pour la formaldéhyde : ce corps a toujours agi comme toxique. L'auteur repousse donc la théorie de Schulz en tant que loi et en ce qui concerne l'influence des substances toxiques sur la croissance des champignons, étant donné que cette loi ne s'applique pas à une partie des substances qui ont été examinées.

M. ROBERG (412) ne veut se permettre aucun jugement sur la loi d'Arndt-Schulz et il ne croit pas que les résultats des expériences de Niethammer (qu'il trouve d'ailleurs en contradiction avec de nombreuses données) soient suffisantes pour la rejeter définitivement.

H. ZELLER (525) a de son côté fait la critique de la loi d'Arndt Schulz. Il trouve que l'augmentation de gaz carbonique produit par la levure est si faible qu'elle ne signifie rien dans un processus biologique. De plus, on observe cette augmentation de fermentation seulement dans des conditions extrêmement favorables ; elle semble liée à la richesse plus ou moins grande en glycogène de la levure ; plus il y a de glycogène, plus il y a de gaz carbonique produit.

Nous venons de voir que A. NIETHAMMER avait dans ses expériences remarqué que certains corps provoquent une action excitante seulement dans des conditions de bonne nutrition. Il faut donc rapprocher ces remarques des observations de Zeller quant à l'influence de la richesse en glycogène de la levure sur la quantité de gaz carbonique produite. CZAPEK (100) en 1913, avait déjà émis la même opinion. Comme HANDOWSKY (209),

H. Zeller trouve que la loi d'Arndt-Schulz semble justifiée seulement pour certaines concentrations excitantes et mortelles. Autrement, elle n'est pas utilisable et ne doit pas donner lieu à des conclusions si générales. Un effet biologique comme cette action stimulante ne peut pas être considéré comme nettement et définitivement mis en évidence, lorsqu'il n'atteint au maximum qu'une valeur de quelques pour cent. Nous allons d'ailleurs voir un peu plus loin comment H. Zeller démontre la véritable cause de ces actions excitantes.

En 1930, H. DANNENBERG (103) fait à son tour une étude critique de la loi d'Arndt-Schulz. Il insiste sur le fait qu'il faut créer, pour la levure étudiée, des conditions optima. La concentration en ions H, aussi bien que les conditions de nutrition, joue un rôle considérable; il faut donc conserver la région optima du pH pour la production du gaz carbonique (pH : 5,0 à 6,0), car des modifications du pH, et par suite, de la production du gaz carbonique, peuvent causer des erreurs dans l'appréciation de la fermentation. Il faut également créer de bonnes conditions de nutrition, sinon les cellules de levure meurent. L'addition d'une substance peut améliorer les conditions vitales et de ce fait la production du gaz carbonique; aussi doit-on faire une différence exacte entre l'excitant toxique et l'excitant nutritif. De plus, — et ceci est très important, — pour apprécier des accélérations de la fermentation dans le sens de la règle d'Arndt-Schulz, il faut pouvoir démontrer qu'il s'agit bien d'un excitant toxique. Ainsi, d'après les considérations ci-dessus, Dannenberg a bien établi ses conditions d'expériences; mais il n'a pas pu obtenir une accélération de la fermentation par l'addition de doses faibles de quinine, de phénol et de sublimé. Ces expériences n'ont donc pas apporté une confirmation à l'exactitude de la loi d'ARNDT-SCHULZ. Avant de porter un jugement concluant sur la valeur de cette règle, l'auteur est d'avis qu'il faut examiner l'action de nombreuses substances sous différentes combinaisons chimiques sur la fermentation des diverses espèces de levures; il faut employer des quantités différentes de levures et de solution nutritive et réaliser l'expérience dans des conditions bien définies d'acidité.

Dans les conclusions de ce chapitre, nous verrons ce que nous pensons, pour notre part, de la loi d'Arndt-Schulz.

Nous venons de voir à quel point des organismes peuvent être sensibles à de très faibles doses de certaines substances (« substances biogénétiques » comme le zinc et le manganèse). On peut opposer à ces résultats des exemples très caractéristiques qui mettent en relief la sensibilité de ces mêmes organismes à d'autres substances (substances toxiques comme l'argent). Par exemple, l'*Aspergillus niger* qui réagit très favorablement à l'addition de 1/10.000.000.000 de manganèse, a son activité sensiblement entravée par l'addition de 1/1.600.000 de nitrate d'argent.

Cette action toxique qui se manifeste avec de très faibles doses de certaines substances a été désignée par différentes expressions : c'est « l'action oligodynamique » de NÆGELI, le *pouvoir antiseptique* » de VINCENT.

Nous pensons qu'il est intéressant d'en dire quelques mots, uniquement pour rappeler à quel point un organisme peut réagir différemment selon l'élément qui lui est offert (même quand celui-ci est à des concentrations extrêmement faibles).

IV. — Action toxique due à de très faibles doses de certaines substances.

A) *Mise en évidence de cette action.*

Rappelons quelques observations concernant ce phénomène qualifié d'« oligodynamique » par NÆGELI (1).

L'action « *oligodynamique* » est l'action nocive exercée sur les microorganismes par des solutions très étendues de certains métaux ou de leurs sels. Celle-ci est la conséquence pure et simple du passage en solution des métaux capables de telles actions.

O. CASAGRANDE et A. SEPPILLI, à qui nous empruntons cette définition, indiquent que ce passage en solution est essentiellement déterminé par des phénomènes résultant de l'oxydation et de l'action du gaz carbonique. Pour ces auteurs, le métal dont l'action à très faibles doses semble le mieux assurer la potabilité des eaux est l'argent; les bacilles typhiques, para-

(1) Comme PH. LASSEUR, nous pensons que « le terme d'action oligodynamique proposé par NÆGELI devrait être abandonné ». Son sens littéral peut en effet prêter à confusion sur la nature du mécanisme de cette action.

typhiques, dysentériques, les vibrions cholériques sont détruits en 2 à 3 heures, par simple contact avec le métal actif.

C'est RAULIN (390) en 1870, qui a signalé le premier que l'*Aspergillus niger* ne pouvait pas se développer dans des vases en argent. NÆGELI (346) en 1893, H. VINCENT (492) en 1895, A. KLING (268), ont fait des observations semblables. Ces auteurs ont noté que des métaux comme l'argent, le cuivre, peuvent entrer en solution dans certaines circonstances et que la seule présence de ces métaux a une action mortelle sur des organismes comme les algues, les bactéries, etc... Cet argent métallique « se dissout » dans les liquides comme l'eau des conduites et l'eau distillée. Il est de même nettement absorbé par le verre et il y pénètre. De ce fait, on a remarqué que des récipients de verre gardent l'action dite « oligodynamique » ainsi acquise, même après avoir subi un nettoyage mécanique. L'argent agit en substance sur les organismes, il y est adsorbé, pénètre à travers les parois cellulaires et provoque son action nocive par des modifications chimiques encore inconnues. En 1896, H. DEVAUX (109) a observé l'empoisonnement spontané de plantes aquatiques telles que : *Elodea*, *Lemna*, *Ceratophyllum*, par les eaux provenant des conduites en plomb de son laboratoire; ces eaux contenaient des doses très minimes de plomb dissous : de 1 à 3 dix millionièmes. DEHERAIN et DEMOUSSY indiquent des quantités analogues pour le cuivre; elles sont très voisines de celles indiquées déjà par Raulin en ce qui concerne l'argent et de celles indiquées par MILLARDET au sujet des très faibles doses de cuivre, qui intoxiquent et tuent les zoospores de mildiou (celles-ci sont tuées avec une solution à 2/10.000.000 ou à 3/10.000.000 de sulfate de cuivre).

Ces observations, d'origine variée, prouvent bien que des traces de certains métaux, tels le plomb, le cuivre, l'argent, sont toxiques pour les plantes, même à des dilutions extraordinairement faibles. En voici encore d'autres : en 1898, H. COUPIN (93) a publié une note sur la toxicité des sels de cuivre à l'égard des végétaux supérieurs. Travaillant sur de jeunes germes de blé, il a employé des solutions de moins en moins concentrées et il a établi qu'il suffit de 0,005 de sulfate de cuivre dans 100 parties d'eau pour tuer la plantule. H. Coupin admet que cette toxicité considérable est due à l'ion cuivre. De même en 1908, B. MOORE et J.-L. HAWKES (338) notent une action toxique sur le bacille

typhique, provoquée par des solutions diluées de certains métaux : surtout le sulfate de cuivre et le nitrate d'argent. Ces auteurs trouvent que la dite action toxique est beaucoup plus marquée avec des solutions préparées à l'aide d'eau distillée, qu'avec des solutions préparées à l'aide d'eau de fontaine ou d'eau de mer; ils pensent que cela est dû à ce que ces dernières contiennent des substances qui diminuent l'ionisation des sels toxiques. G. BERTRAND (36 bis), expérimentant l'action de solutions très diluées de nitrate d'argent sur l'*Aspergillus niger*, a toujours observé une action nocive.

Parmi les auteurs qui ont encore signalé l'existence d'une telle action nous mentionnerons : P. SAXL (428) qui l'a constatée pour le cuivre et l'argent vis-à-vis de certains microbes pathogènes et qui a même provoqué un mode de « désinfection oligodynamique »; THIELE et WOLF (478) qui ont vérifié l'action « dite oligodynamique » de l'argent; K. SPIRO (461) qui a expérimenté l'action toxique de faibles doses de cuivre; BECHHOLD (23) qui a montré que les microbes sont plus ou moins réfractaires à cette action suivant les espèces; O. BAIL (16) qui a remarqué que les espèces à gram positif subissent plus faiblement l'action « oligodynamique » que les espèces à gram négatif; R. DÆRR (120) qui a retrouvé l'action « oligodynamique » de l'argent et l'action bactéricide d'une eau contenant des traces de ce métal, action d'ailleurs affaiblie par la présence de chlorure de sodium; F. HODER (236) qui recommande d'employer des solutions physiologiques préparées avec du chlorure de sodium très pur et de l'eau distillée dans des appareils de verre (et non en cuivre); Max NEISSER et FRANZ EICHBAUM (350) qui ont étudié l'action « oligodynamique » de certains métaux; PUSCHEL (383) qui a attiré l'attention sur les causes d'erreurs provoquées par l'action « oligodynamique », dans les travaux bactériologiques; PH. LASSEUR, M. PIERRET, A. DUPAIX et C. MAGUITOT (287) qui ont confirmé que l'eau mise en contact avec de l'argent peut acquérir des propriétés toxiques qui se manifestent même après l'enlèvement du métal; METALNIKOFF (323) qui a étudié le pouvoir bactéricide de l'eau soumise à l'action combinée de l'argent métallique et du courant continu, et qui a trouvé que l'action bactéricide est ainsi rendue plus intense et plus rapide.

Nous serions incomplet si nous ne citions le texte de P. CARNOT (64) concernant l'action *des doses minuscules* : « Si l'on abaisse

« progressivement le taux de l'antiseptique, on est étonné parfois
« de constater combien loin se poursuit son action sur la cellule
« microbienne. C'est ainsi que Ch. RICHET, dans ses belles études
« sur le ferment lactique (qui fournit un critérium de mesure
« par l'acide fabriqué) est arrivé à constater cette action jusqu'à
« des dilutions extrêmes (un centième de milligramme par litre).
« RAULIN avait, d'autre part, montré jusqu'à quelles doses infini-
« tésimales continuent d'agir certaines substances, l'argent
« notamment, sur l'*Aspergillus niger*. Il est probable qu'à ces
« dilutions extrêmes se produisent des phénomènes d'ionisation
« et qu'il intervient alors une sorte de dissociation de la matière,
« que RICHET compare à l'état d'un gaz raréfié dans l'ampoule
« de Crookes. Les actions ainsi produites se manifestent souvent
« dans les deux sens : accélérantes ou empêchantes. L'intérêt
« de ces faits est évident, de même que celui des actions médi-
« camenteuses à doses minuscules. » D'après DANYSZ, le bichlo-
« rure de mercure stérilise une eau très infectée lorsqu'il est dilué
« au millième et même au cinq-millième; le nitrate d'argent est
« très efficace au millième.

Pour produire une action suffisamment bactéricide sans léser les tissus, on ne devrait employer les sels de mercure qu'à partir de 1 p. 300.000 et le nitrate d'argent qu'à partir de 1 p. 200.000.

CAZIN et Mlle KRONGOLD ont employé avec succès sur les plaies cette action du nitrate d'argent à doses minuscules.

Par contre, pour CLÉMENT (85), la présence de l'argent n'est pas incompatible avec le développement de l'*Aspergillus niger*.

H. FREUNDLICH et K. SOLLNER (158) en 1928 résument ainsi l'action toxique provoquée par de très petites quantités d'argent :

1^o Si on laisse de l'argent pur sous forme de plaques fines pendant plusieurs jours dans de l'eau ordinaire, ou dans de l'eau distillée, il s'y dissout de façon appréciable, ce que l'on peut démontrer à l'aide du *procédé microdokimastique* de HABER (206) et ses collaborateurs. Une surface d'argent de 40 cm² abandonne en 3 jours, en solution dans 100 cm³ d'eau, une quantité de métal de 2×10^{-5} gr.

2^o Dans une eau ainsi traitée, des algues (*spirogyres*) fixent la plus grande quantité de l'argent dissout et montrent une lésion caractéristique, appelée « oligodynamique » par NÆGELI (346). Cette fixation d'argent par les algues a été mise également en évidence par le *procédé microdokimastique* : 1 gramme

d'algues sèches contient alors à peu près 5×10^{-5} gr. d'argent. Ces mesures montrent donc que la soi-disant action « oligodynamique » de l'argent est en réalité une influence substantielle directe.

3° L'argent ainsi dissout se trouve sous forme d'ions Ag. En effet, on peut obtenir la même action toxique avec une solution de nitrate d'argent dont les ions Ag. se trouvent à la même concentration. La mise en solution de l'argent se fait probablement sous l'action de l'oxygène et du gaz carbonique.

4° Des récipients de verre qui ont été en contact d'une manière quelconque avec de l'argent, conservent leur action « oligodynamique », même après lavage.

HOROVITZ (239), Mlle WRIGHT (521) et d'autres auteurs ont observé, eux aussi, que les ions Ag. sont adsorbés par le verre et qu'ils pénètrent ensuite à l'intérieur grâce à la structure du verre. Ces ions Ag. peuvent d'ailleurs repasser en solution ou être extraits du verre par les algues qui les fixent fortement.

5° Le phénomène par lequel l'argent ne se laisse pas déceler dans des récipients de verre après évaporation de solutions diluées de nitrate d'argent, tandis qu'on peut le déceler dans des récipients de quartz, est en relation avec cette adsorption de l'argent par le verre et sa pénétration dans l'intérieur de ce verre, surtout sous de fortes températures. Ce phénomène a été confirmé par une expérience; l'argent a pu être décelé de façon mikrodokimastique, après évaporation complète et redissolution dans une solution diluée d'acide azotique.

D'après DØRR (120), V. NEERGARD (348), EGG et YUNG (130), LEITNER (297), dans une telle action toxique, il s'agit d'une action d'ions. HEUBNER et HAILER (232), en ce qui concerne le bichlorure de mercure, pensent que ce sont les combinaisons complexes de mercure qui sont le support de l'action bactéricide. M. NEISSER et F. EICHBAUM (350), faisant une revue critique de cette action « oligodynamique » des métaux, émettent les considérations suivantes : d'une façon générale, l'activité dépend du nombre des ions métalliques présents dans la solution. En outre, il faut envisager l'action bactéricide propre des ions. Cette activité s'expérimente le mieux dans l'eau distillée; pour d'autres milieux, tels que la gélose, la gélatine, le bouillon peptoné, etc..., leur contenu en sels ou en substances colloïdales provoque généralement une influence empêchante et rarement favorisante, qui

contribue par conséquent à fausser les résultats. Le métal étudié peut, soit être simplement dissout, soit subir des modifications secondaires après solution dans le solvant. De plus, le genre de la solution dépend du contenu en électrolytes et en albumines du solvant.

A. KLING (268) en 1932 a étudié le pouvoir bactéricide de l'argent métallique vis-à-vis du bacille typhique et du colibacille. Cet auteur a trouvé que l'argent possède une légère solubilité dans l'eau (et surtout après avoir subi de nombreux lavages successifs à l'ammoniaque, à l'eau, à l'alcool, à l'éther et à l'eau distillée). Cette dissolution de l'argent métallique dans l'eau distillée se fait à un pH allant de 5,8 à 8,0. Après un contact de plusieurs jours, la quantité d'argent dosée à l'état de chlorures dans le résidu de l'évaporation est de 0 gr. 0005 d'argent-métal. La concentration d'argent en solution est de 5×10^{-5} , et les bacilles y sont tués en 3 ou 4 heures. Kling a observé que l'eau distillée, activée par de l'argent métallique, dans laquelle du métal se trouve dissout à la concentration de 1×10^{-5} , se comporte au point de vue bactéricide de la même façon que l'eau distillée dans laquelle on a introduit du nitrate d'argent à cette même teneur de 1×10^{-5} . Donc, conclut l'auteur, cette action bactéricide provient d'une *faible solubilité* du métal dans l'eau, solubilité qui permet à l'argent de manifester ses propriétés antiseptiques très marquées.

Fr.-L. HAHN (208) en 1932 pense aussi que l'action « oligodynamique » de l'argent tient à la présence d'une certaine quantité d'ions-argent libres dans la solution. Mais, s'il se trouve dans cette solution un sel, un cyanure par exemple, qui, se combinant à l'argent, forme un complexe, l'action bactéricide est inhibée, et même, avec un gros excès de cyanure, l'argent devient complètement inactif; l'ion complexe ainsi formé n'a aucune action bactéricide.

Cette contradiction a été expliquée par N. LEITNER (297) : l'action bactéricide se produit, lorsqu'il y a adsorption des ions argent par les bactéries. L'addition de cyanure abaisse la concentration en ions argent libres; les bactéries adsorbent donc de moins en moins de ces ions, par suite l'action bactéricide diminue. Afin que cette action se manifeste dans les solutions de sels complexes d'argent, il faut qu'il existe au début une concentration d'ions argent suffisante pour la préparation d'une adsorption

sensible. Une réaction ainsi commencée est continuée par la décomposition du complexe.

J. SENDERLING (442) en 1933 a fait une étude détaillée de l'action « oligodynamique » de nombreux éléments sur diverses bactéries. Les essais ont été effectués sur des plaques de gélose et l'élément y était apporté sous forme solide. L'auteur, après ensemencement et mise à l'étuve de ces plaques, a apprécié et comparé la grandeur des zones libres de bactéries. Celle-ci est étroite pour le cuivre, l'argent et l'or; elle est plus grande pour le cadmium et le mercure, plus importante encore pour l'arsenic, l'antimoine et le tellure. Plus le cercle est grand, plus la durée de la vie est courte : le cadmium, le mercure, l'arsenic et l'antimoine ont montré la plus forte action sur la durée de la vie; l'or et le bismuth ont fait preuve de la plus faible influence.

Dans ces expériences, l'action « oligodynamique » repose donc principalement sur le pouvoir de diffusion du métal dans le milieu. Tous les éléments étudiés ont pu y être décelés chimiquement. En outre, il faut tenir compte du fait que la gélose agit comme colloïde protecteur.

B) Essais d'utilisation pratique de l'action toxique exercée par de très faibles quantités de certains métaux.

On a cherché à appliquer les propriétés nocives de très petites doses d'argent.

Ch. KRAUSE (274) en 1930 signale la possibilité de stériliser l'eau et d'autres liquides par contact avec des substances à « action oligodynamique ». Au lieu des métaux, on peut employer leurs sels, leurs alliages, ou d'autres combinaisons. Les liquides sont filtrés avant ou après ce traitement. L'auteur propose une stérilisation de l'eau par de l'argent qu'il nomme « catadynique » et qui est un argent pur, soufflé et à disposition lamellaire. G. CASAGRANDE et A. SEPELLI (67) en 1934 considèrent également que « l'action oligodynamique » des métaux est liée à la présence des ions métalliques dans les solutions. Pour eux, l'argent possède une action stérilisante énergétique. Un simple contact avec la substance active détruit les bacilles typhiques et paratyphiques ainsi que les vibrions cholériques. F. HODER (236) en 1932 a fait des essais avec diverses eaux : il trouve l'eau distillée du commerce particulièrement active, beaucoup plus

que l'eau de conduite ordinaire. Et il préconise de n'employer pour la distillation de l'eau à usage bactériologique que des appareils de verre : on doit éviter l'emploi d'appareils de cuivre à cause de l'action oligodynamique des ions Cu qui se dissolvent dans l'eau.

On a cherché à titrer cette « action oligodynamique ». Certains auteurs, comme EICHBAUM (133) en 1932, préconisent la méthode biologique, parce que les mesures de conductivité donnent des résultats incertains. Cet auteur apprécie « l'effet oligodynamique » d'une eau argentique, en le comparant à l'action d'une « eau oligodynamique-étalon ». Une telle eau-étalon tue le bacille coli d'une suspension microbienne titrée, en 2 heures à 37°. Cette méthode permet également d'apprécier la sensibilité d'une espèce microbienne déterminée à l'action toxique de l'argent. D'autres auteurs et parmi eux, I. BUHRMANN (54) en 1933, préférèrent l'emploi d'une réaction chimique, telle l'accélération de l'oxydation du leucovert malachite.

METALNIKOFF (323) en 1935 a obtenu une eau d'un pouvoir bactéricide bien plus élevé encore en employant l'action combinée de l'argent métallique et du courant électrique continu. Il assure la mort des germes en quelques minutes et même en quelques secondes. Ses travaux confirment le pouvoir bactéricide très élevé de l'argent métallique : en milieu aqueux à une concentration inférieure à 1 pour 5.000.000, le bacille coli et le staphylocoque sont tués en 3 heures.

Nous venons donc de voir que de très faibles quantités de certains métaux peuvent être soit des toxiques (argent), soit des excitants (zinc) de la croissance des végétaux inférieurs. Il semble bien difficile d'expliquer ces deux faits. Les très intéressantes expériences de H. DEVAUX semblent éclairer certains côtés de ces phénomènes. Nous allons maintenant les exposer.

C) Essais d'explication de l'action toxique de très faibles doses de métaux ou de sels métalliques.

En 1901, H. DEVAUX (110) a montré que les ions des métaux contenus dans les parois des cellules vivantes sont remplaçables, par simple lavage, par d'autres ions quelconques, pourvu qu'ils soient du même signe +. Cet auteur a trouvé dès cette époque

que cet échange d'ions peut être à la fois réversible et total. Le point de départ de ses recherches a été l'observation fortuite, faite en 1896, de l'empoisonnement de plantes aquatiques (*Elodea canadensis*), par l'eau sortant des conduites en plomb de son laboratoire. Cette eau avait une concentration en plomb de M. 10-6 : il s'agit donc d'une *action oligodynamique* analogue à celle qui a été décrite par Raulin en 1869, puis par Nægeli en 1893. Pour H. Devaux, la plante vivante précipite et concentre le métal lourd au fur et à mesure qu'il lui est offert, même s'il lui est offert en solution très diluée. Il n'y a donc pas, d'après cette conception, de « *concentration limite* » pour la toxicité d'un sel. La concentration semble jouer un rôle secondaire dans la toxicité. Le phénomène serait d'origine purement chimique et se passerait essentiellement dans les membranes des cellules. L'attraction des parois cellulaires pour les métaux est spécifique; elle est due exclusivement aux *composés pectiques*. Il se produit donc un échange réversible entre les substances pectiques de la paroi cellulaire et les ions métalliques apportés aux tissus par la solution étrangère.

H. Devaux a encore découvert un phénomène très intéressant : il est possible de déplacer les métaux alcalins par tous les autres métaux, en particulier par le calcium; et celui-ci peut être inversement chassé par les métaux alcalins. Devaux a également remarqué tout de suite que les métaux lourds et alcalino-terreux semblent plus fortement fixés que les métaux alcalins, c'est-à-dire plus difficiles à déplacer que ces derniers. Il faut donc noter que la valence des ions est susceptible de jouer un rôle important.

En 1916, Devaux étudie *quantitativement* les déplacements d'ions dans les plantes vivantes. A ce sujet il observe :

1^o Que la proportion de métal bivalent prise dans une solution de concentration donnée est, en première approximation, *indépendante de la concentration du métal* et ne dépend que de sa nature;

2^o Que la quantité de métal retenu est naturellement indépendante du temps que dure l'expérience, à partir d'une durée minimum;

3^o Qu'il y a un équilibre entre la solution et le tissu; si les masses de solution et de tissu sont comparables (de 1 à 10 envi-

ron), le rapport de la quantité de métal fixé à la quantité initiale de ce métal, ou *coefficient de partage*, est indépendant des masses respectives de végétal et de solution ainsi que de la concentration initiale.

Cette observation montre que les lois de l'affinité chimique jouent dans ce phénomène; l'intensité de la fixation dépend de la nature du métal fixé et non de la membrane végétale. Ces faits, qui ne s'observent que pendant des temps très courts (allant de quelques secondes à quelques minutes), sont pratiquement instantanés par rapport à la croissance des organismes. Ils en sont donc indépendants, ainsi que des propriétés proprement biologiques des cellules vivantes. De plus, l'expérience montre que la quantité totale de plomb susceptible d'entrer dans une cellule est au plus égale à la somme des valences salifiables de cette cellule, cette somme de valences ayant été déduite par calcul à partir de l'analyse chimique du tissu envisagé. Le métal est donc retenu par les forces de valence primaires et par les groupements salifiables des acides organiques insolubles de la membrane cellulaire.

Le fait très intéressant qui ressort des expériences de DEVAUX, c'est que la membrane cellulaire se comporte comme un corps inerte, qui subit passivement, et dans des limites insoupçonnées, les variations de composition du milieu ambiant. Cette membrane se comporte comme un corps poreux à l'échelle moléculaire, où la plupart des ions positifs circulent sans difficulté; en raison de sa charge négative, la membrane repousse au contraire les ions négatifs ou anions. La cellule se comporte donc comme perméable aux molécules neutres et aux ions positifs. Il est probable que les très gros ions ou que les grosses molécules sont arrêtés par la membrane cellulaire.

La théorie de la membrane *fonctionnant comme ultra-filtre*, si brillamment défendue par RUHLAND depuis 1908, vient compléter et s'ajouter à celle de H. Devaux.

GENEVOIS (183) pense que ce phénomène d'ultra-filtration peut être considéré comme peu important, lorsque l'on considère les échanges d'ions; il semble cependant jouer dans le cas de l'ion sodium d'après MOND. Ces déplacements d'ions que H. Devaux conçoit comme un simple phénomène chimique, ont pu être interprétés par des lois de la chimie, notamment la loi d'action de masse : « A l'état d'équilibre, le rapport de la concen-

tration de l'ion déplaçant à la concentration de l'ion déplacé, atteint dans la solution une valeur fixe, indépendante des valeurs absolues des concentrations et des quantités absolues des substances en présence, lorsque les deux ions ont la même valence ». On peut écrire par exemple, en ce qui concerne les ions

$$\text{plomb et calcium : } \frac{(\text{Pb} + +)}{(\text{Ca} + +)} = K$$

P. GENAUD (181) a vérifié ces conclusions en opérant avec la levure de bière. Puis, dans une série d'expériences, cet auteur pousse bien plus loin nos connaissances sur la cellule vivante. Il reprend la méthode de Devaux. Il agite le tissu étudié avec des solutions contenant des concentrations 2.10^{-3} N d'ions Pb. Au bout de 6 à 7 lavages, la cellule est saturée de plomb. Il remarque que la quantité d'ions Pb, fixée par la cellule vivante, est inférieure à la quantité totale d'ions préexistant dans la levure. Les cellules, dont presque tous les cations sont remplacés par des ions Pb, sont encore vivantes et cela est prouvé par trois faits : 1° après traitement au plomb, l'intensité de la respiration et de la fermentation reste la même; 2° la coloration vitale des cellules de levure se fait identiquement, après comme avant le traitement au plomb; 3° enfin la croissance de ces levures, repiquées sur gélose nutritive, s'effectue avec la même rapidité que pour les levures non traitées au plomb. Non seulement la levure *survit* à ce traitement, mais, remplacée dans son milieu habituel de croissance elle s'y multiplie indéfiniment et normalement. 70 à 80 % des cations ayant été remplacés par du plomb, on ne peut donc affirmer que la cellule resterait vivante en l'absence de toute trace de potassium et de calcium. Dès lors, il est possible d'émettre cette conclusion très importante : « On peut faire varier la constitution « minérale d'une cellule vivante dans des limites insoupçonnées « jusqu'ici, sans porter la moindre atteinte à l'intégrité des fonctions de cette cellule vivante. Il en résulte immédiatement « cette notion que la masse principale des ions K, Ca, etc... ne « joue aucun rôle chimique défini si ce n'est, purement et simplement, de salifier des fonctions acides. Cette conclusion, bien « entendu, n'est valable que pour des cellules de levures ».

Disons encore que ce sont la membrane et les vacuoles qui fixent la plus grande quantité de plomb, et même toute la quantité décelable de plomb. Quant au protoplasma vivant de la cellule de levure, il se comporte comme un corps *sensiblement*

neutre, qui contient certainement moins du 1/10 de la quantité totale des ions de métaux que possède la cellule. C'est seulement quand les cellules sont mortes que la fixation du plomb se fait également sur le protoplasma. Ces cellules mortes fixent d'ailleurs 3 à 4 fois plus d'ions Pb que les cellules de levure vivantes. La mort de la cellule a entraîné une sorte d'écroulement des molécules constituant le protoplasma et a libéré ainsi un nombre considérable de groupements acides.

D) *Particularités de l'ion argent.*

Nous attirons maintenant l'attention sur un phénomène signalé par P. GENAUD (182) et concernant l'ion argent :

La cellule vivante présente d'autres affinités que celles purement ioniques. *Elle est capable de réduire l'ion Ag*, même en solution très étendue. La cellule vivante est tuée pour des doses d'argent infinitésimales, par rapport aux quantités d'ions qu'elle possède elle-même, alors que de grandes quantités de plomb ne lui sont nullement toxiques. Tandis qu'un ion monovalent comme Ag ne devrait pénétrer qu'en quantité minime aux faibles concentrations où il est utilisé, la liqueur argentique perd absolument tout l'argent qu'elle contient. La cellule vivante se comporte ici, non comme un acide insoluble, mais comme un aldéhyde insoluble, comme un sucre insoluble.

On ne peut pas confondre cette *affinité réductrice de la cellule vivante* avec le phénomène d'échange des ions.

V. — Hypothèses émises par différents auteurs pour expliquer les actions favorisantes.

Parmi les théories proposées pour expliquer ces actions favorisantes, il convient de citer en premier lieu celle qui considère ce *phénomène* comme étant essentiellement *physiologique*. Cette théorie a été proposée par G. BERTRAND et M. JAVILLIER; elle a été vérifiée par leurs expériences.

M. JAVILLIER (251, 253 *bis*) pense « qu'il est possible que la « plante réagisse à certaines excitations chimiques comme elle « réagit à certaines excitations physiques : électriques par « exemple, de diverses façons et entre autres par une activation « de croissance, par surproduction de matière; mais il existe

« parmi les composés minéraux de véritables *catalyseurs physiologiques*, c'est-à-dire des « *metteurs en marche de réaction* », des « *accélérateurs de ces réactions physiologiques* » qui interviennent « normalement dans la chimie cellulaire ». Et M. Javillier pose cette question : « Pour l'*Aspergillus niger*, le zinc est-il un excitant de la nutrition en raison de sa toxicité ou un catalyseur physiologique? » Les préférences de M. Javillier vont à la seconde hypothèse, parce que la première n'a pas de valeur générale. Pour appuyer cet argument, il considère qu'il existe des éléments qui sont toxiques pour l'*Aspergillus niger* et qui ne provoquent pas d'accélération de croissance de ce champignon : C'est le cas de l'argent pour lequel G. BERTRAND (36 bis) n'a jamais pu mettre en évidence la moindre action excitante, quelle que soit la concentration envisagée. De plus, en l'absence de zinc, les conidies apparaissent très rapidement en quelques heures : la plante, dans un milieu aussi défavorable, se dépêche donc d'assurer sa conservation, tandis que quelques millièmes de milligrammes de zinc retardent cette sporulation et favorisent la croissance ; dans ce dernier cas, l'apparition des conidies ne s'effectue qu'après épuisement avancé du milieu, c'est-à-dire après 4 jours : « Le zinc ne raccourcit donc pas le *cycle évolutif* de la plante, il l'étend, le dilate ». (M. JAVILLIER (251).)

En ce qui concerne l'action excitante de très faibles quantités de manganèse sur la végétation de l'*Aspergillus niger*, G. BERTRAND (35 bis, 36) écrit : « Tous ces corps, trop peu abondants pour entrer dans la composition des appareils de soutien ou des substances de réserve, ne peuvent avoir comme le manganèse qu'un rôle d'intermédiaire, de catalyseur dans les réactions chimiques ». Et il ajoute : « Leur rôle est, jusqu'à un certain point comparable à celui des ferments et on peut les appeler, autant pour faire image que par commodité, des *infinités chimiques* ».

M. Javillier a approfondi encore davantage ce problème ; il a cherché à établir « quel est le *mécanisme d'action* d'un élément très favorisant comme le zinc. Parlant de ce métal, l'auteur note avec raison : « Se contenter, en effet, de dire que le zinc est un *élément catalytique* » c'est faire allusion à la disproportion entre sa masse et ses effets, le rapprocher d'autres éléments, fer, calcium, manganèse dont nous connaissons un peu mieux le mode d'action physiologique, mais ce n'est pas éclairer les processus

chimiques auxquels il participe dans la cellule vivante. Se contenter, d'autre part, de le considérer comme un « *excitant* » du protoplasme, c'est éluder la difficulté du problème chimique qui se pose et substituer un mot à une explication ». Et M. JAVILLIER (250 *bis*) a apporté des précisions très intéressantes en examinant d'une façon systématique le mode de consommation des éléments chimiques nécessaires à la croissance de la plante, suivant qu'on lui offre du zinc ou qu'on l'en prive. C'est ainsi qu'il a pu établir l'influence de cet élément « sur certains actes physiologiques de la plante : il règle la consommation du sucre, il rend plus économique le fonctionnement de la plante en diminuant la dépense d'entretien au profit de la dépense de construction; il est impuissant à rendre assimilable l'azote nitrique seul, mais il influe au contraire grandement sur l'utilisation de l'azote ammoniacal; il remanie la minéralisation de la plante, non seulement en pénétrant lui-même dans les tissus de celle-ci, mais encore en entraînant avec lui d'autres agents catalytiques et en faisant varier le taux de fixation de certains éléments plastiques ». M. JAVILLIER (251 *bis*) a également expérimenté qu'en l'absence de zinc, l'*Aspergillus* secrète notablement moins de sucrase.

Les mêmes arguments peuvent être soutenus vis-à-vis du manganèse. Les expériences de G. Bertrand et M. Javillier ont mis en évidence la fixation de cet élément par la plante. On peut répéter à son égard ce qui a été dit pour le zinc. Comme pour ce dernier, le manganèse pénètre dans la cellule et il doit y favoriser activement l'assimilation des aliments.

De telles actions ne semblent donc pas devoir être considérées comme des réactions à des actions toxiques. Réfutant cette dernière hypothèse, M. Javillier ajoute : « Singulier poison qui fait pousser une plante là où, sans lui, elle ne pousse pas ! »

Cette théorie de l'action toxique est cependant soutenue par certains auteurs, en particulier par Ch. LEPIERRE (299). Cet auteur explique l'action favorisante de très petites quantités de zinc sur l'*Aspergillus niger* par le fait que c'est un élément toxique. Le grand développement de la plante en présence de zinc provient d'une réaction de défense, d'une réaction à une intoxication; il constitue une manifestation de la lutte entre le végétal et la substance nocive, lutte qui lui permet de fixer cette substance.

Il ne semble pas que cette théorie puisse être admise surtout

en ce qui concerne le zinc et le manganèse. Il est incontestable que l'explication proposée par G. Bertrand et M. Javillier, a été vérifiée par des expériences très concluantes. Il ne faut pas oublier que ces savants ont démontré que le zinc et le manganèse sont des éléments d'une très grande utilité, voire même *indispensables*. Il semble donc difficile d'envisager une « réaction à une action toxique » en ce qui concerne de tels éléments.

De plus, il y a encore un autre argument qui n'est pas en faveur de cette hypothèse : il existe des substances toxiques, l'argent par exemple, qui ne favorisent jamais la croissance de l'*Aspergillus niger*, quelle que soit leur dilution. Voici ce que G. BERTRAND (36 bis) écrit à ce sujet : « Comme l'a montré « Raulin, en 1870, l'argent exerce à l'état dissous une influence « extrêmement nocive sur la moisissure. Si la théorie de l'excitation toxique est vraie, on doit, en opérant avec des solutions « argentiques de plus en plus étendues, atteindre un degré de « dilution critique auquel le végétal cesse d'être défavorablement « affecté, un autre plus grand où la croissance est au contraire « excitée et finir, avec des dilutions extrêmes, par ne plus avoir « aucune espèce d'action ». G. Bertrand n'a jamais observé la moindre action favorisante avec le nitrate d'argent qu'il a expérimenté. Voici donc un « toxique » qui n'est pas excitant à faible dose.

On pourrait à la rigueur admettre momentanément cette théorie de l'action toxique pour des substances dont le rôle est encore inconnu ou n'a pu être déterminé avec certitude. L'idée de « catalyseur physiologique » semble moins acceptable (peut-être à tort, d'ailleurs) pour des éléments comme le mercure ou le plomb ; dans de tels cas on peut admettre, au moins provisoirement, l'hypothèse de l'action toxique.

Il convient de signaler encore *la théorie de l'action antiseptique*. Elle a été soutenue par COUPIN, lors de ses expériences sur le zinc. D'après cet auteur, cet élément agirait comme antiseptique, empêchant dans les cultures non stérilisées le développement d'organismes étrangers ; il favoriserait donc ainsi la poussée du *Stérigmatocystis nigra*.

Mais M. Javillier a repris les expériences de Raulin en opérant sur des milieux stérilisés et il les a confirmées et étendues. Par cela même, il élimine donc cette hypothèse. Il se demande de plus avec raison : « Quelle valeur antiseptique pourrait bien avoir le sulfate de zinc à de telles dilutions ? ».

Nous allons encore donner quelques hypothèses, proposées pour expliquer les actions favorisantes de certaines substances employées à petites doses sur le développement des bactéries et des champignons.

V. HENRI (222) pense que les actions excitantes des terres rares sur le bacille tuberculeux seraient dues à ce que ces corps présentent deux états d'oxydation différents et agissent, par suite, comme catalyseurs dans les réactions d'oxydation. Les bacilles tuberculeux étant très avides d'oxygène, il faut produire pour leur développement des oxydations énergiques et V. Henri émet l'hypothèse que les sels de terres rares, activant les réactions d'oxydation, favorisent ainsi le développement du bacille tuberculeux. Il explique le pouvoir antiseptique par la formation d'eau oxygénée et de produits à potentiel d'oxydation très élevé résultant de ces réactions, et cela en raison directe de la quantité de sel ajoutée. L'action antiseptique serait donc due à la présence d'un excès de ces produits secondaires.

P. CARNOT (64) dans une étude sur les antiseptiques dont nous avons déjà parlé, dit, en parlant de cette exaltation produite par de petites quantités de certaines substances : « Cette action est « à rapprocher de l'action stimulante, cytopoïétique ou cytophy-lactique, exercée par de petites doses d'un agent toxique sur « les cellules diverses des glandes ou des tissus, et qui provoquent « une exaltation de leurs fonctions et de leur prolifération ». Cet auteur semblerait donc être partisan de l'excitation provoquée par certains corps en raison de leur toxicité.

GUTHERZ (204) cherche à rapprocher la loi d'Arndt-Schulz de la théorie de Weigert, ou théorie de la lésion primaire des tissus. Cet auteur pense que l'idée principale des deux théories est « qu'une très petite lésion provoque une excitation de la cellule. Celle-ci déclencherait *une superrégulation* et provoquerait ainsi une hypérbiose ».

CZAPEK (100) est de la même opinion et il interprète l'effet stimulant des solutions toxiques diluées comme un processus autorégulateur. Une telle conception pourrait peut être expliquer le fait que la paralysie occasionnée par un élément toxique est plus vite vaincue par des cellules qui contiennent du glycogène, ces cellules supportant une concentration toxique plus forte. C'est ainsi qu'une levure contenant du glycogène supporte encore une concentration de sublimé au 1/50.000 et une concentration

de sulfate de cuivre au 1/25.000, alors que la levure sans glycogène voit les chiffres correspondants devenir 1/83.000 pour le sublimé et 1/50.000 pour le sulfate de cuivre. H. ZELLER (525) résume ainsi le mécanisme de ces actions : l'échange métabolique de la levure est paralysé par l'addition de poison. Le degré de la paralysie est déterminé par la concentration de ce poison. La cellule de levure, par la transformation des substances qu'elle contient, réussit à vaincre petit à petit cette paralysie. S'il y a beaucoup de glycogène, il se forme beaucoup de gaz carbonique ; et plus abondante est la quantité de gaz carbonique formée dans la cellule, plus est grande la paralysie qu'elle peut vaincre.

Nous citerons maintenant les intéressantes remarques de WINSLOW et DOLLOFF (510). Ces auteurs ont observé que le moment où l'on peut saisir l'effet stimulant varie selon la concentration du sel mis en jeu. Il y a en quelque sorte un déclenchement plus ou moins rapide de la stimulation qui dépend de la concentration du sel étudié.

Nos expériences ont d'ailleurs montré des phénomènes analogues en ce qui concerne les actions du nitrate mercurique et du nitrate de plomb.

SHAUGHNESSY et WINSLOW (450) en 1927 ont démontré que les solutions faibles, soit de Na, soit de Ca (elles sont beaucoup plus diluées naturellement dans ce dernier cas), augmentent apparemment la perméabilité, tandis que des solutions plus concentrées la diminuent. Se basant sur ces résultats, ces auteurs pensent que, en ce qui concerne leur effet sur la vitalité et la perméabilité, l'influence des cations sur la cellule bactérienne, qu'ils soient seuls ou combinés, pourrait peut-être se voir expliquée sans qu'il soit besoin d'attribuer des propriétés spécifiques et caractéristiques à quelque cation particulier, mais simplement en supposant que *les cations diffèrent quantitativement dans leur activité*. Les travaux de Shaughnessy et Winslow au sujet de l'influence du potassium, du sodium, du magnésium sur la vitalité du bacille coli dans un milieu synthétique simple, indiquent que l'effet de ces sels est *qualitativement identique*, mais que le magnésium est *quantitativement 8 fois environ plus actif* à une concentration donnée que chacun des ions monovalents à cette même concentration. Ces deux auteurs pensent que les cations exercent un certain effet primaire sur la cellule bactérienne (cela est également possible pour les autres cellules animales et végétales)

qui est *qualitativement le même* pour tous les cations (même peut-être pour l'hydrogène), mais qui est *quantitativement* différent pour chacun des cations. A ce point de vue, les ions bivalents sont 8 à 10 fois plus puissants que les ions monovalents. Des ions tels que Hg et H sont plusieurs milliers de fois plus puissants que certains ions monovalents.

Divers travaux et en particulier ceux de SHEARER (444, 445) en 1917-1919 et de SCHAUGHNESSY et WINSLOW (450) en 1927 suggèrent que cette action sur la vitalité est liée à un accroissement de la perméabilité de la membrane qui est dû aux *sels dilués* et à une décroissance de la perméabilité qui est provoquée par les *sels concentrés*; cette dernière est d'ailleurs suivie par un accroissement de perméabilité d'une espèce différente de celui qui est produit par les sels dilués et il est probablement dû à une rupture ou à quelque changement physique se produisant dans la membrane cellulaire.

Ces derniers auteurs ont introduit la notion d'*antagonisme quantitatif*. Nous dirons très succinctement en quoi cela consiste : Si un sel A produit un effet donné et que l'addition d'un sel B détruit cet effet, pouvons-nous aussi détruire cet effet en augmentant simplement la concentration du sel A? Si cela est possible, nous serons en présence d'un *antagonisme quantitatif*; pour ces auteurs l'*antagonisme qualitatif* paraît jouer un rôle peu important en ce qui concerne l'influence des cations sur la vitalité bactérienne.

P. GIRARD et R. AUDUBERT (186) expliquent certaines actions biologiques du lanthane dans un milieu de culture par la décharge, que provoque ce métal, des charges négatives des parois cellulaires des microbes. Ces auteurs peuvent restaurer l'état électrique de la paroi cellulaire et disséminer des cellules agglutinées, en agitant l'agglutinat dans une solution qui renferme des ions négatifs tri ou tétravalents (citrate ou ferrocyanure), puis en filtrant à l'aide du vide sur un filtre assez fin qui ne laisse passer que des microbes isolés. Dans ces conditions, ces chercheurs obtiennent une désagglutination parfaite. Ils constatent ensuite que selon la valeur de cette charge, on observe les phénomènes biologiques suivants : soit une hypervégétation des cultures, soit une résistance aux actions lytiques, soit des effets antiseptiques; et ils émettent la conclusion suivante : « Il n'est pas douteux que, dans ces divers effets biologiques que détermine la

présence des sels de lanthane dans le milieu de culture ou d'émulsion, seule intervient la décharge électrique de la paroi des microbes par les ions La^{+++} , car, sans changer la concentration de ces ions dans le milieu, il suffit, par l'addition d'un nombre un peu supérieur d'ions négatifs trivalents, de neutraliser leur action électrique sur la paroi pour que ces effets biologiques disparaissent du coup. »

MOUSSALI (340) ne pense pas que cette interprétation puisse être généralisée pour tous les sels de terres rares. Les actions différentes de ces sels sur les propriétés biologiques des microbes et sur leur pouvoir végétatif montrent, au contraire, qu'il y a des différences d'actions et des spécificités.

Nous signalerons enfin une explication originale de N. DAVIS. Celui-ci emploie un raisonnement pour la commodité duquel il assimile les bactéries à des gouttes d'huile. Le voici succinctement : si l'on fait un jet d'huile dans l'eau, les gouttes formées ont une dimension qui dépend de la tension interfaciale entre l'huile et l'eau. Ayant construit un appareil qui permet de mesurer exactement le volume d'un nombre déterminé de gouttes d'huile, Davis compare ainsi la tension développée entre une huile donnée et diverses solutions dans lesquelles elle est dispersée. (A la place d'huile, il a utilisé de l'acide oléique et les solutions étudiées ont été des solutions de chlorures appartenant à 12 métaux différents). Il a pu ainsi constater que ces diverses solutions de chlorures métalliques modifient la dimension d'une goutte d'huile. Il en a déduit qu'il peut très bien exister un effet similaire de ces solutions sur les bactéries en croissance. En effet, déterminant les concentrations moléculaires de chacun de ces chlorures mis dans des bouillons peptonés (qui empêchent juste la croissance des microbes) et les comparant aux valeurs des tensions des gouttes d'huile au contact de ces mêmes chlorures, il a pu constater que les résultats rangés en série présentent entre eux un parallélisme marqué, et que, dans les deux cas, les douze chlorures étudiés se mettent, à peu d'exceptions près, dans le même ordre.

Pour cet auteur, les effets stimulants et toxiques des cations peuvent s'expliquer par les modifications de la tension interfaciale entre la bactérie et le milieu de croissance, — modifications occasionnées par la présence de sels métalliques dans le bouillon de culture,

De tous les phénomènes que nous venons d'exposer il ressort que certains sels ont une action favorisante et accélérante sur la poussée de certains organismes, tels que champignons, levures, bactéries, pour de très faibles doses, — une action indifférente pour des doses un peu plus fortes, — et une action défavorable ou inhibitrice pour des concentrations encore plus élevées.

Les auteurs qui ont étudié ces phénomènes ont déterminé ces variations de poussée par des techniques variées. En ce qui concerne les microbes, ils ont apprécié : soit l'intensité ou la vitesse de formation d'un pigment (expériences de Galli-Valerio, de Thiry, de Frouin, d'Aguhlon et Sazerac sur le bacille pyocyanique), soit la mensuration d'un voile (expériences de Becquerel sur le bacille tuberculeux), soit le poids de culture formée (expérience de Frouin sur le bacille tuberculeux), soit le plus ou moins grand trouble de la culture (expériences de Hotchkiss, Winslow et Dolloff et de divers auteurs). D'autres expérimentateurs enfin ont essayé de faire des expériences plus précises en effectuant la numération des colonies développées sur plaques de gélose; mais ces auteurs ne faisaient qu'une seule numération par expérience, soit à 8 jours comme Urbain et Goret, soit à 18 ou 24 heures comme Winslow et Dolloff.

Dès lors, nous avons pensé qu'il serait intéressant d'étudier l'action de certains sels métalliques sur la poussée microbienne en dénombrant les germes à intervalles bien déterminés, toujours dans les mêmes conditions et avec les mêmes méthodes. Nous avons expérimenté avec des concentrations très faibles, moyennes et plus fortes, en les comparant toujours avec une culture témoin, qui ne contenait pas le sel métallique étudié. Nous avons ainsi tracé des courbes de poussées et nous avons pu mettre rigoureusement en évidence ces phénomènes d'exaltation et d'inhibition signalés par les auteurs précédents. En un mot, nous avons voulu établir numériquement et avec autant de précision que possible, ou tout au moins d'une manière plus rigoureuse que celle employée par les auteurs, ces actions, si variables suivant la dose, de quelques sels métalliques sur le croît bactérien.

CHAPITRE DEUXIÈME

I. — Expériences personnelles

1^o *Choix du microbe.*

Nous avons choisi le bacille pyocyanique. Ce bacille présente, en effet, les avantages suivants : il est facile à cultiver ; il pousse rapidement ; son métabolisme souvent étudié est relativement bien connu ; il est mobile ; ses cellules-filles se séparent facilement : il se produit donc très peu de chaînes d'éléments, si gênantes dans la numération directe, et peu d'amas difficiles à dissocier constituant des causes d'erreur dans les numérations par ensemencement. Par ailleurs, les dimensions du bacille pyocyanique sont assez grandes, ce qui est précieux pour les numérations directes. Il est anaérobie facultatif et donne des colonies très visibles, même à l'intérieur des plaques de gélose. Il est peu exigeant quant au milieu ; il peut même se contenter d'un seul acide aminé, comme J. GALIMARD et L. LACOMME l'ont montré. Enfin il possède un pigment bien caractéristique permettant de le déterminer avec certitude et offrant la facilité, par son étude, d'enregistrer les manifestations du microbe.

Souche utilisée et conservation.

Dans toutes nos expériences, nous avons utilisé un bacille pyocyanique provenant de l'Institut Pasteur et correspondant à la race A de GESSARD (188), variété pyocyanogène. Cette souche conservée sur bouillon gélatiné, au frais et à l'abri de la lumière, était repiquée tous les mois.

Pour expérimenter ce microbe, nous repiquions préalablement la souche mère sur bouillon, puis nous lui faisons subir deux passages successifs sur bouillon gélosé incliné. Nos ense-

mencements définitifs sur bouillon peptoné dialysé ont toujours été effectués à partir de cette deuxième culture sur gélose, âgée de 18 heures. Nous ensemencions ainsi des microbes en pleine vitalité; il est inutile d'attendre 24 heures, moment où la phase logarithmique est terminée.

2° *Matériel employé.*

Toute la verrerie employée : ballons, Erlenmeyer, boîtes de Pétri, tubes à essais, était en verre-pyrex. Nous avons toujours soigneusement et de nombreuses fois lavé et rincé cette verrerie avant la préparation de chaque série d'essais. De plus, les ballons devant contenir le bouillon dialysé ont toujours été pris neufs pour chaque expérience. Ces ballons neufs étaient lavés d'abord avec une solution d'acide chlorhydrique diluée, puis avec de l'eau distillée chaude, et rincés un grand nombre de fois à l'eau distillée froide. Les derniers rinçages étaient même effectués avec de l'eau tri-distillée.

3° *Milieux employés.*

a) Bouillon à l'extrait de viande Liebig gélosé à 30 o/oo.

Ce milieu destiné au repiquage des souches et à la numération des microbes par la méthode d'ensemencement après dilution sur plaques de gélose, a une préparation qui se fait en deux temps : 1° préparation du bouillon à l'extrait de viande Liebig; 2° préparation du bouillon gélosé.

1° *Préparation du bouillon à l'extrait de viande Liebig.* — On prend :

Extrait de viande Liebig	10 gr.
Peptone bactériologique Byla	20 —
Chlorure de sodium	5
Eau distillée	1.000 —

On fait dissoudre l'extrait de viande, la peptone et le chlorure de sodium dans l'eau distillée, en chauffant doucement et en agitant constamment. On laisse refroidir et on ajuste à $\text{pH} = 7,0$ avec de la lessive de soude diluée. On porte ensuite à

l'autoclave à 120° pendant 15 minutes, on filtre à chaud sur un filtre préalablement mouillé à l'eau bouillante. On répartit et on stérilise à 115° pendant 20 minutes. Le liquide ainsi obtenu est fortement coloré en jaune-brun, en général limpide, mais pouvant être parfois légèrement opalescent.

2° *Préparation du bouillon gélosé.* — On coupe 30 grammes de gélose séchée en petits morceaux et on les met à macérer dans l'eau pendant 1 heure environ. On exprime la gélose ainsi gonflée et on l'ajoute dans un litre de bouillon à l'extrait de viande Liebig. On porte ce mélange pendant une dizaine de minutes à 80°-85° pour en dissoudre la plus grande partie, en agitant continuellement. On ramène au pH : 7,0 si cela est nécessaire, et on porte à l'autoclave à 120° pendant 45 minutes, pour achever la dissolution de la gélose. En sortant de l'autoclave, on filtre sur un filtre Chardin qui vient d'être fortement ébouillanté. Il est recommandé d'effectuer la filtration dans un autoclave chaud, afin de la rendre plus rapide. On vérifie le pH à nouveau et on le ramène à 7,0 si cela est nécessaire. On répartit ce milieu en tubes, par quantités variables selon l'emploi auquel est destiné le bouillon. On stérilise enfin à 115° pendant 20 minutes.

b) Milieu d'expériences.

Comme nous l'avons vu précédemment, notre milieu d'expérience est de constitution aussi simple que possible. Nous avons toujours employé une eau peptonée ayant subi une dialyse de 15 jours à la glacière. La préparation de ce milieu ayant déjà été décrite dans notre premier chapitre, nous n'y reviendrons pas. Rappelons simplement que la concentration en peptone est de 20 grammes par litre et que son pH est ajusté à 7,0 avec une solution d'ammoniaque pure.

Nous avons régulièrement opéré nos essais sur 50 cm³ de bouillon, répartis dans des ballons-pyrex de 125 cm³. L'addition du sel étudié est faite directement dans ces ballons sous forme de solutions titrées et ajoutées en quantités telles, que les 50 cm³ de bouillon contiennent les fractions moléculaires voulues : M/1.000, M/2.000, M/10.000, M/100.000, etc. L'addition de ces sels dans la solution de peptone produit un précipité

d'autant plus abondant que ceux-ci sont ajoutés en plus grande quantité. Ce précipité est surtout visible pour des concentrations M/500, M/1.000 et M/2.000; plus les dilutions sont grandes, moins le précipité devient perceptible, pour ne l'être plus du tout au cas de faibles concentrations, telles : M/100.000 et au delà. Ce précipité est soluble dans les acides, mais une addition d'acides ne permettrait plus à la poussée bactérienne de s'effectuer; aussi, n'en avons-nous pas tenu compte.

Les sels employés : nitrates de lanthane, de cérium, de plomb, de mercure, d'argent, sont des sels très purs qui proviennent tous de la maison Rhône-Poulenc, à laquelle ils ont été commandés spécialement. Nous avons toujours effectué les solutions titrées de ces sels avec de l'eau tri-distillée, dans laquelle nous dissolvions les fractions moléculaires nécessaires, pesées à la balance de précision.

4^o *Choix des Cations.*

En raison des résultats intéressants fournis par les travaux de A. FROUIN, concernant l'action des terres rares sur le bacille pyocyanique et le bacille tuberculeux, nous avons choisi le *lanthane* et le *cérium*. Nous avons pensé que l'action de ces ions pouvait être particulièrement effective, en raison de leur valence et de leur forte charge électrique.

Ce sont les très beaux travaux de DEVAUX qui nous ont poussé à mettre en expérience le *plomb*.

Nous avons également voulu étudier le comportement d'un antiseptique puissant : le *mercure*, dont quelques auteurs ont signalé l'action favorisante, lorsqu'il est employé à de très faibles concentrations. Le plomb et le mercure sont également des métaux lourds; aussi avons-nous voulu expérimenter encore un autre métal qui, bien que n'étant pas un métal lourd, est particulièrement intéressant, nous voulons parler de l'*argent*.

5^o *Choix de l'anion.*

Afin de mieux comparer l'influence des cations envisagés, nous avons pensé qu'il était préférable d'utiliser toujours le même anion; nous avons donc expérimenté tous nos cations

sous forme de nitrates. Ces sels sont, en effet, très favorables à la nutrition des bactéries; ils le sont plus que les chlorures et les sulfates.

De plus, ils présentent l'avantage d'être très solubles dans les milieux que nous avons employés.

6^o *Mode opératoire utilisé.*

Toutes nos expériences ont été strictement effectuées dans les mêmes conditions, ne faisant varier qu'un seul facteur : la concentration du sel expérimenté.

Pour chaque métal, nous avons étudié un certain nombre de concentrations et, pour chacune de celles-ci, nous avons fait parallèlement une expérience-témoin comportant la culture sur le même milieu privé du sel étudié.

Les ensemencements ont toujours été effectués à la concentration de 500.000 germes visibles par centimètre-cube. Ceux-ci ont été prélevés à partir d'une émulsion faite à l'aide d'une culture de bacille pyocyanique sur gélose, âgée de 18 heures. Nous avons constamment opéré avec 50 cm³ d'eau peptonée dialysée, contenue dans des ballons en pyrex. La culture microbienne s'est toujours développée dans une étuve réglée à 37°. Nos prélèvements ont toujours été effectués : 3 h., 6 h., 9 h., 24 h., 48 h., 3 jours, 6 jours après l'ensemencement. Puis nous avons vérifié la vitalité de la culture, toujours maintenue à 37°, par des repiquages sur gélose inclinée, effectués d'abord tous les 15 jours, puis tous les mois. Lors de chaque prélèvement, nous avons procédé simultanément aux deux méthodes de numération que nous avons décrites dans notre premier chapitre.

a) Numération microscopique de tous les éléments microbiens morts et vivants, par l'emploi de la méthode comparative de Wright-Fries (cette méthode donne l'ensemble des microbes visibles).

b) Numération sur plaques de gélose des éléments capables de se reproduire après dilution et ensemencement sur ce milieu (cette méthode donne les microbes « vivants », les microbes les plus résistants).

7^o *Marche suivie pour une expérience.*

a) *Préparation de l'émulsion microbienne destinée à l'ensemencement :*

Au moyen d'une souche ayant subi les repiquages indiqués ci-dessus, on fait une suspension, en émulsionnant deux anses chargées de bacille pyocyanique, dans 10 cm³ d'eau distillée stérile. Cette émulsion doit être très soigneusement effectuée, afin d'éviter les amas bactériens et il faut avoir soin d'agiter vivement le mélange, en présence de billes de verre pour obtenir une suspension bien homogène. L'émulsion ainsi obtenue renferme de 500.000.000 à 1.000.000.000 de germes par centimètre-cube.

b) *Titrage de l'émulsion microbienne :*

Comme technique de dénombrement, nous avons utilisé la méthode comparative de Wright-Fries (exposée au chapitre premier). L'étalement est effectué à partir d'un mélange constitué par 1 cm³ d'émulsion microbienne avec 1 cm³ de suspension titrée de levure. Il faut compter au moins une heure et demie pour la préparation de l'émulsion, l'étalement, la coloration et la numération. Pendant ce temps, la suspension microbienne est conservée à la glacière à l'abri de la lumière. Il y a intérêt à ne pas prolonger inutilement la durée de cette opération, certains auteurs ayant observé une action nocive de l'eau distillée sur les bactéries (A. Duthoit, Winslow et Brooke).

c) *Ensemencement :*

Cet ensemencement a toujours été de 500.000 germes visibles par centimètre-cube. Connaissant le nombre de germes par centimètre-cube de l'émulsion que nous venons de titrer, nous en déduisons facilement le volume à prélever, afin que le volume de notre milieu d'expérience (soit 50 cm³) reçoive 500.000 germes par centimètre-cube. Ce volume est prélevé, à l'aide d'une pipette stérile graduée au 1/100^e de centimètre-cube, dans l'émulsion rendue bien homogène par agitation; puis il est introduit dans le milieu de culture déjà porté à 37^o. Ce milieu ainsi ensemencé est bien agité et on procède immédiatement à la numération des

bacilles capables de se reproduire sur gélose. (C'est le dénombrement à l'heure 0). On porte ensuite la culture à l'étuve réglée à 37°.

d) *Séjour à l'étuve.*

Le ballon contenant la culture est ainsi maintenu à l'étuve, pendant le premier jour; pour de longues expériences, il y a intérêt à capsuler le ballon au bout de 24 ou 48 heures. Au moment de chaque prélèvement, on agite longuement et vivement le milieu. Le bacille pyocyanique formant des voiles difficiles à dissocier complètement, il ne faut pas se borner à remuer le liquide toujours dans le même sens, mais procéder à de vives agitations dans tous les sens, afin de donner aux billes de verre des mouvements irréguliers et rapides, capables de briser les amas et les voiles microbiens.

Nous exposerons maintenant l'une de nos expériences, en détaillant les opérations effectuées.

II. — Étude détaillée d'une multiplication microbienne normale.

MULTIPLICATION DU BACILLE PYOCYANIQUE DANS UNE SOLUTION DE PEPTONE DIALYSÉE :

Nous avons suffisamment décrit (chapitre premier) les méthodes de numération des microbes. Nous nous contenterons donc d'exposer les autres manipulations en prenant un exemple au hasard.

A) *Premières manipulations :*

La veille de l'expérience, nous procédons au deuxième repiquage sur gélose inclinée, du bacille pyocyanique destiné à être expérimenté. Le même jour, nous faisons une émulsion de levure titrée. Celle-ci renferme 284.000.000 de cellules par centimètre-cube. Le lendemain, nous faisons notre émulsion à partir de la culture sur gélose, dans 10 cm³ d'eau distillée stérile, puis nous procédons à sa numération par la méthode comparative, après avoir étalé, fixé, coloré sur 4 lames un mélange à

parties égales de suspension de levure et d'émulsion microbienne. Nous comptons 1.969 bacilles pour 490 levures. Le nombre de microbes par centimètre cube sera :

$$\frac{1.969}{490} \times 284.000.000 = 1.136.000.000 \text{ germes par cm}^3.$$

Voulant ensemer 50 cm³ de bouillon à raison de 500.000 germes par cm³, nous devons donc apporter : $50 \times 500.000 = 25.000.000$ de microbes dans notre milieu.

Il nous faut, par conséquent, en prélever un volume égal à :

$$\frac{1 \text{ cm}^3 \times 25}{1.136} = 0 \text{ cm}^3 022$$

Nous ajoutons donc à nos 50 cm³ de milieu, portés préalablement à 37°, 0 cm³ 022 de l'émulsion rendue bien homogène par agitation, ou 0 cm³ 22 de la dilution au 1/10 de cette même émulsion. Le milieu est vivement agité pendant 4 à 5 minutes; on en prélève 1 cm³, quantité qui servira à déterminer le nombre de bacilles capables de se multiplier sur gélose solidifiée. Cette prise d'essai est versée dans un ballon renfermant 100 cm³ d'eau distillée stérile. La culture est, de son côté, mise à l'étuve à 37° et on note l'heure où l'expérience commence : c'est l'heure 0. On agite alors vivement cette première dilution à 1/100; on en prélève 1 cm³ que l'on verse dans un second ballon renfermant également 100 cm³ d'eau distillée stérile. Nous avons donc une dilution à 1/10.000.

Pendant ces dilutions, nous avons fait fondre 3 tubes de bouillon gélosé et nous les avons amenés à une température de 42 à 45°. Dans chacun des tubes, nous versons 1 cm³ de notre deuxième ballon de dilution (soit la dilution à 1/10.000); nous les roulons énergiquement entre les deux mains et nous les coulons avec précaution dans des boîtes de Pétri stériles. Après refroidissement les trois boîtes de Pétri sont mises à l'étuve à 37° (couvrir en bas); et, au bout de 3 jours, nous procédons à la numération des colonies développées.

Dans notre exemple, nous trouvons : 32, 24 et 26 colonies sur chaque plaque de gélose. La moyenne étant :

$$\frac{32 + 24 + 26}{3} = 27,3$$

le milieu ensemencé renfermait « à l'heure 0 » : $27,3 \times 10.000 = 273.000$ bacilles, capables de se reproduire sur gélose, par centimètre-cube.

Les colonies de bacilles pyocyaniques poussant ainsi en boîtes de Pétri peuvent se trouver sous deux aspects :

1° Les colonies qui se développent en surface présentent des dimensions variables et une coloration verte.

2° Les colonies qui poussent en profondeur ont un aspect en navette et une couleur brun foncé.

B) *Prélèvements effectués :*

1° *A l'ensemencement ou heure 0, nous avons donc :*

a) Nombre de bacilles visibles : 500.000 germes par cm^3 ;

b) Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée 100×100

Nombre de colonies sur les 3 plaques.. $24 + 32 + 26 = 82$

Moyenne par plaque..... $\frac{82}{3} = 27,3$

Nombre de microbes par cm^3 : 273.000 germes par cm^3 .

Au bout de 3 heures, nous faisons un second prélèvement. Nous procédons toujours de la même façon que précédemment.

2° *Culture à la 3^e heure :*

a) Nombre de bacilles visibles :

1 cm^3 de culture + 1 cm^3 émulsion de levure.

Compté 61 bacilles pour 2.619 levures, d'où :

Nombre de bacilles visibles par cm^3 :

$$\frac{61}{2.619} \times 284.000.000 = 6.532.000 \text{ germes par } \text{cm}^3$$

b) Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée 100×100

Nombre de colonies sur les 3 plaques. $41 + 55 + 62 = 158$

Moyenne par plaque..... $\frac{158}{3} = 52,6$

Nombre de microbes par cm^3 : 526.000 germes par cm^3 .

3^o Culture à la 6^e heure :

Liquide encore clair, un peu moins liquide cependant que le témoin.

a) Nombre de bacilles visibles :

1 cm³ de culture + 1 cm³ émulsion levure

Compté 447 bacilles pour 891 levures

D'où nombre de bacilles visibles par cm³ :

$$\frac{447}{891} \times 284.000.000 = 142.000.000 \text{ germes par cm}^3.$$

b) Nombre de microbes capables de se reproduire :

Dilution utilisée 10 × 100 × 100

Nombre de colonies sur les 3 plaques 102 + 115 + 108 = 325

Moyenne par plaque $\frac{325}{3} = 109$

Nombre de microbes par cm³ : 10.900.000 germes par cm³.

4^o Culture à la 9^e heure :

Le liquide est devenu légèrement trouble.

a) Nombre de bacilles visibles :

1 cm³ de culture + 1 cm³ émulsion de levure

Compté 1.970 bacilles pour 498 levures

D'où nombre de bacilles visibles par cm³ :

$$\frac{1970}{498} \times 284.000.000 = 1.107.600.000 \text{ germes par cm}^3.$$

b) Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée 100 × 100 × 100

Nombre de colonies sur les 3 plaques. 225 + 158 + 195 = 578

Moyenne par plaque $\frac{578}{3} = 192$

D'où nombre de microbes par cm³ : 192.000.000 germes par cm³.

5^o Culture à la 24^e heure :

Le milieu est devenu très trouble. *Pas de voile à la surface.* (1)

(1) Il convient d'insister ici sur le fait que nos cultures n'ont *jamais* présenté le voile caractéristique du bacille pyocyanique. R. David a fait des observations analogues concernant des cultures effectuées sur des milieux peu chargés en matières nutritives.

a) Nombre de bacilles visibles :

1 cm³ de culture *diluée au 1/10* + 1 cm³ émulsion de levure
Compté 879 bacilles pour 378 levures.

d'où nombre de bacilles visibles par cm³ :

$$\frac{879}{378} \times 284.000.000 \times 10 = 6.532.000.000 \text{ germes par cm}^3.$$

b) Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée 100 × 100 × 100 × 100

Nombre de colonies sur les 3 plaques 29 + 13 + 18 = 60

Moyenne par plaque $\frac{60}{3} = 20$

d'où nombre de microbes par cm³ :

2.000.000.000 germes par cm³.

6^o Culture à la 48^e heure.

Liquide très trouble, de couleur jaune verdâtre. *Pas de voile.*

a) Nombre de bacilles visibles :

1 cm³ de culture *diluée au 1/10* + 1 cm³ émulsion de levure
compté 1.751 bacilles pour 547 levures

d'où nombre de bacilles visibles par cm³ :

$$\frac{1.751}{547} \times 284.000.000 \times 10 = 9.088.000.000 \text{ germes par cm}^3.$$

b) Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée 100 × 100 × 100 × 100

Nombre de colonies sur les 3 plaques 17 + 26 + 16 = 59

Moyenne par plaque $\frac{59}{3} = 19,6$

d'où nombre de microbes par cm³ :

1.960.000.000 germes par cm³.

7^o Culture au 3^e jour.

Liquide trouble, couleur verdâtre. *Pas de voile.*

a) Nombre de bacilles visibles :

1 cm³ culture *diluée au 1/10* + 1 cm³ émulsion de levure
compté 1.702 bacilles pour 743 levures

d'où nombre de bacilles visibles par cm³ :

$$\frac{1.702}{743} \times 284.000.000 \times 10 = 6.532.000.000 \text{ germes par cm}^3.$$

b) Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée $100 \times 100 \times 100 \times 100$

Nombre de colonies sur les 3 plaques $15 + 9 + 9 = 33$

Moyenne par plaque..... $\frac{33}{3} = 11$

d'où nombre de microbes par cm^3 : 1.100.000.000 germes par cm^3 .

8^o Culture au 6^e jour.

Liquide trouble. *Pas de voile.*

a) Nombre de bacilles visibles :

1 cm^3 culture *diluée au 1/10* + 1 cm^3 émulsion de levure
compté 1.426 bacilles pour 642 levures

d'où nombre de bacilles visibles par cm^3 :

$\frac{1.426}{642} \times 284.000.000 \times 10 = 6.248.000.000$ germes par cm^3 .

b) Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée $100 \times 100 \times 100$

Nombre de colonies sur les 3 plaques $622 + 648 + 653 = 1923$

Moyenne par plaque..... $\frac{1.923}{3} = 641$

d'où nombre de microbes par cm^3 : 641.000.000 germes par cm^3 .

A partir de ce moment la numération des bacilles visibles devient très difficile, étant donnée la présence de précipités divers, de bacilles autolysés prenant le colorant d'une manière très variable, etc. Il est donc préférable, à partir de ce moment, pour éviter de nombreuses causes d'erreur, de dénombrer seulement les bacilles capables de se reproduire sur gélose.

9^o Culture âgée de 10 jours :

Liquide trouble, qui brunit légèrement.

Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée $100 \times 100 \times 100$

Nombre de colonies sur les 3 plaques $402 + 383 + 389 = 1.174$

Moyenne par plaque..... $\frac{1.174}{3} = 391,3$

d'où nombre de microbes par cm^3 : 391.300.000 germes par cm^3 .

10^e Culture âgée de 15 jours :

Culture trouble, couleur rougeâtre.

Nombre de bacilles capables de se reproduire :

Dilution utilisée $100 \times 100 \times 100$

Nombre de colonies sur les 3 plaques $12 + 16 + 10 = 38$

Moyenne par plaque..... $\frac{38}{3} = 12,6$

d'où nombre de microbes par cm³ : 12.600.000 germes par cm³.

A partir de ce moment, nous n'avons plus fait de dénombrement et nous avons vérifié seulement la vitalité de la culture, en ensemençant sur gélose inclinée, tous les mois, quelques gouttes de cette culture prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur. Observons ici que, de temps en temps, il est utile de vérifier au microscope que la culture est uniquement constituée de bacille pyocyanique. On verra plus loin que nous avons pu conserver certaines cultures pendant plus d'une année, et cela même en présence de certains cations réputés toxiques.

EXPOSÉ DES RÉSULTATS OBTENUS

Nous venons d'exposer en détail la marche d'une de nos expériences. Nous allons maintenant présenter les résultats obtenus dans celles-ci sous forme de tableaux et de courbes (1). Dans les tableaux nous indiquerons (et ceci pour chaque concentration et son témoin correspondant) les différentes heures de prélèvement, le nombre de microbes par cm³ à chacun de ces prélèvements, les logarithmes de ces nombres, le nombre de bipartitions produites dans une période donnée, calculé à partir de ces logarithmes, et le temps de génération ou temps nécessaire à un bacille pour donner un second bacille (2).

A ce sujet, rappelons encore que si l'on désigne par *a* le nombre des microbes à un instant donné, et par *b* le nombre des microbes

(1) Les chiffres que nous donnons constituent chacun le résultat de plusieurs expériences.

(2) Nous avons également donné des tableaux qui ne contiennent que les nombre de microbes aux moments des différents prélèvements. Ils permettent une meilleure comparaison des chiffres obtenus avec ou sans cation et selon la technique utilisée.

au bout d'un temps déterminé, le nombre x de bipartitions survenues pendant cette période est fourni par la formule :

$$x = \frac{\log b - \log a}{\log 2}$$

Par suite, le temps de génération correspondant, t , est donné par la relation : $t = \frac{\text{durée de la période}}{x}$

Nous rappelons également que nous entendons par « *rapport de vitalité* » le rapport :

$$\frac{\text{Nombre de microbes capables de se reproduire}}{\text{Nombre de microbes visibles}}$$

(Les microbes visibles comportent la totalité des microbes qu'il est possible de compter au moyen de la méthode de WRIGHT-FRIES; les microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose comportent les microbes qui se sont développés après dilutions et ensemencement d'un volume défini de l'émulsion-mère. Sur nos graphiques, nous les désignons par l'abréviation : « microbes capables de se reproduire ».

Nous avons d'autre part représenté ces résultats par les courbes suivantes :

- 1^o Courbes du nombre de microbes en fonction du temps;
 - 2^o Courbes des logarithmes du nombre de microbes en fonction du temps;
 - 3^o Nous avons également fait figurer à une plus grande échelle les premières heures de ces deux premières séries de courbes, étant donnée l'importance de la multiplication pendant cette période;
- Enfin, nous avons pensé qu'il serait intéressant de donner les :
- 4^o Courbes du nombre de générations en fonction du temps;
 - 5^o Courbes du « rapport de vitalité » en fonction du temps.

Nous donnons d'abord, en une suite continue de tableaux et de courbes, les résultats de tous nos essais; ensuite, nous les comparerons et les discuterons.

I

ACTION DU NITRATE
DE LANTHANE

CONCENTRATION M/500

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture contenant M/500 de nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture contenant M/500 de nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	186.000	343.000
3 ^h	7.242.200	11.232.800	10.000	933.000
6 ^h	32.516.000	183.272.000	2.600	12.560.000
9 ^h	11.824.000	1.537.120.000	30	217.000.000
24 ^h	11.232.800	5.320.800.000	30	2.560.000.000
48 ^h	8.868.000	8.158.560.000	0	1.660.000.000
72 ^h	8.000.000	7.390.000.000	0	1.400.000.000

CONCENTRATION M/1000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture contenant M/1000 de nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture contenant M/1000 de nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	300.000	273.000
3 ^h	6.532.000	6.532.000	333.000	526.000
6 ^h	5.680.000	142.000.000	466.000	10.900.000
9 ^h	42.600.000	1.107.600.000	4.300.000	192.000.000
24 ^h	255.600.000	6.532.000.000	356.000	2.000.000.000
48 ^h	73.840.000	9.088.000.000	46.600	1.960.000.000
72 ^h	56.800.000	6.532.000.000	3.000	1.100.000.000
6 jours	7.100.000	6.248.000.000	0	641.000.000

CONCENTRATION M/3000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture contenant M/3000 de nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture contenant M/3000 de nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	400.000	376.000
3 ^h	22.152.000	13.064.000	4.300.000	880.000
6 ^h	244.240.000	176.000.000	43.000.000	19.000.000
9 ^h	1.704.000.000	1.136.000.000	178.000.000	265.000.000
24 ^h	5.680.000.000	5.396.000.000	360.000.000	2.600.000.000
48 ^h	2.584.400.000	6.816.000.000	843.000.000	1.560.000.000
72 ^h	2.328.800.000	5.964.000.000	66.600.000	1.400.000.000
6 jours	1.164.400.000	5.396.000.000	20.200.000	571.000.000

CONCENTRATION M/4500

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture contenant M/4500 de nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture contenant M/4500 de nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	320.000	276.000
3 ^h	37.388.000	20.132.000	403.000	580.000
6 ^h	241.584.000	261.716.000	10.830.000	12.530.000
9 ^h	1.610.560.000	1.265.440.000	167.600.000	220.000.000
24 ^h	4.026.400.000	6.039.600.000	1.660.000.000	2.660.000.000
48 ^h	1.783.120.000	9.893.440.000	820.000.000	1.360.000.000
72 ^h	1.294.200.000	5.752.000.000	173.000.000	860.000.000
6 jours	1.265.440.000	4.026.400.000	81.300.000	676.300.000

CONCENTRATION M/6000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture contenant M/6000 de nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture contenant M/6000 de nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	333.000	270.000
3 ^h	17.200.000	8.600.000	400.000	960.000
6 ^h	236.500.000	122.550.000	8.110.000	13.040.000
9 ^h	1.290.000.000	1.247.000.000	173.000.000	233.000.000
24 ^h	6.450.000.000	6.135.000.000	2.760.000.000	2.630.000.000
48 ^h	2.945.000.000	6.235.000.000	479.000.000	1.060.000.000
72 ^h	2.644.000.000	6.665.000.000	526.000.000	1.310.000.000
6 jours	795.000.000	5.095.000.000	186.000.000	709.000.000

CONCENTRATION M/30.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture contenant M/30.000 de nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture contenant M/30.000 de nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	350.000	343.000
3 ^h	28.082.000	11.232.000	1.300.000	933.000
6 ^h	443.400.000	183.272.000	47.830.000	12.560.000
9 ^h	2.423.920.000	1.537.120.000	314.000.000	217.000.000
24 ^h	7.832.080.000	5.320.800.000	5.030.000.000	2.560.000.000
48 ^h	7.981.200.000	8.158.560.000	2.230.000.000	1.660.000.000
72 ^h	6.621.440.000	7.537.400.000	2.513.000.000	1.400.000.000
6 jours	7.685.600.000	7.390.000.000	1.573.000.000	746.000.000

CONCENTRATION M/500

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 ^h	7,2	11,2	5,85	7,04	0,53	4,5	339	40
6 ^h	32,5	183,2	7,51	8,26	5,5	4	32	45
9 ^h	11,8	1537,1	7,07	9,18	-1,4	3	(128)	60
24 ^h	11,2	5320,8	7,04	9,72	-0,1	1,8	(9000)	500
48 ^h	8,8	8158,5	6,94	9,91	-0,3	0,6	(4800)	2400
72 ^h	8,8	7537,4	6,94	9,87	0	-0,1		(14400)
6 jours								

CONCENTRATION M/500

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culturs témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,186	0,343	5,26	5,43	-4,2	1,7	(42)	105
3 ^h	0,01	0,933	4	5,96	-1,9	3,7	(90)	48
6 ^h	0,02	12,5	3,41	7,09	-6,4	4	(28)	45
9 ^h	0,003	217	1,47	8,33	0	3,5		256
24 ^h	0,003	2560	1,47	9,40				(2600)
48 ^h	0	1660	0	9,22		-0,6		(7200)
72 ^h	0	1400		9,14		-0,2		(4800)
6 jours	0	746		8,87		-0,9		

CONCENTRATION M/1000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	6,5	6,5	6,81	6,81	3,7	3,7	48	48
6 h	5,6	142	6,75	8,14	-0,02	4,4	(9000)	40
9 h	42,6	1107,6	7,62	9,04	2,9	3	62	60
24 h	255,6	6532	8,40	9,81	2,6	2,5	347	360
48 h	73,8	9088	7,86	9,95	-0,54	0,46	(800)	3130
72 h	56,8	6532	7,75	9,81	-0,36	-0,14	(400)	(3630)
6 jours	7,1	6248	6,85	9,79	-3	-0,06	(480)	(24000)

CONCENTRATION M/1000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 h	0,300	0,273	5,47	5,43				
3 h	0,333	0,526	5,52	5,72	0,05	0,96	3600	187
6 h	0,466	10,9	5,66	7,03	0,46	4,3	348	41
9 h	4,3	192	6,63	8,28	3,2	4,1	56	43
24 h	0,366	2000	5,56	9,30	-0,2	3,4	(4500)	264
48 h	0,04	1960	4,66	9,29	-3	-0,03	(480)	(48000)
72 h	0,003	1100	3,47	9,04	-3,9	-0,83	(368)	(1734)
6 jours	0	641	0,77	8,80	-9	-0,8	(480)	(5400)

CONCENTRATION M/3000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 ^h	22,5	13	7,34	7,12	5,5	4,7	32	38
6 ^h	244,2	176	8,38	8,24	3,4	3,7	52	48
9 ^h	1704	1136	9,23	9,05	2,8	6,0	64	30
24 ^h	5680	5396	9,75	9,73	1,7	2,6	528	346
48 ^h	2584	6816	9,41	9,83	-1,1	0,3	(163)	4800
72 ^h	2328,8	5964	9,36	9,77	-0,1	-0,2	(14400)	(7200)
6 jours	1164,4	5396	9,06	9,73	-1	-0,13	(4320)	(34000)

CONCENTRATION M/3000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,400	0,376	5,60	5,57				
3 ^h	4,3	0,880	6,63	5,94	3,4	1,2	52	150
6 ^h	43	19	7,63	7,27	3,3	4,4	54	40
9 ^h	178	265	8,25	8,42	2	3,8	90	47
24 ^h	360	2600	8,55	9,41	1	3,3	900	272
48 ^h	843	1560	8,92	9,19	1,2	-0,7	1200	(2057)
72 ^h	66,6	1400	7,81	9,14	-3,7	-0,1	(389)	(14400)
6 jours	20,2	571	7,30	8,75	-1,7	-1,3	(1168)	(3322)

CONCENTRATION M/4.500

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 ^h	37,3	20,1	7,57	7,30	5,9	5,3	30	33
6 ^h	241,5	261,7	8,38	8,41	2,7	3,7	66	42
9 ^h	1610,5	1265,4	9,20	9,10	2,7	2,3	66	78
24 ^h	4026,4	6039,6	9,60	9,78	1,3	2,6	692	346
48 ^h	1783	9893,4	9,25	9,99	-1	0,7	(1440)	2059
72 ^h	1294,2	5852	9,11	9,75	-0,4	-0,8	(3800)	(1800)
6 jours	1265,4	4026,4	9,10	9,60	-0,03	-0,5	(144000)	(8640)

CONCENTRATION M/4.500

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,320	0,276	5,50	5,44				
3 ^h	0,403	0,580	5,60	5,76	0,3	1	600	180
6 ^h	10,8	12,5	7,03	7,09	1,4	4,4	128	40
9 ^h	167,6	220	8,22	8,34	4	4	45	45
24 ^h	1660	2660	9,22	9,42	3,3	3,9	272	256
48 ^h	820	1360	8,91	9,13	-1	-0,9	(1440)	(1600)
72 ^h	173	860	8,23	8,93	-2,6	-0,6	(553)	(2400)
6 jours	81	673,3	7,91	8,82	-1	-0,3	(4320)	(14400)

CONCENTRATION M/6000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en millions)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 ^h	17,2	8,6	7,23	6,93	5,1	4,1	35	49
6 ^h	236,5	122,5	8,37	8,08	3,8	3,8	48	47
9 ^h	1290	1247	9,11	9,09	2,4	3,3	75	54
24 ^h	6450	6135	9,80	9,78	2,3	2,3	390	391
48 ^h	2945	6235	9,46	9,79	-1,1	0,01	(1308)	144000
72 ^h	2644,5	6665	9,42	9,82	-0,1	0,1	(14400)	43200
6 jours	795,5	5095	8,92	9,70	-1,6	-0,4	(2700)	(14400)

CONCENTRATION M 6000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,333	0,270	5,52	5,43				
3 ^h	0,400	0,960	5,60	5,98	0,2	1,5	900	120
6 ^h	8,1	13	6,90	7,11	4,3	3,7	41	48
9 ^h	173	233	8,23	8,36	4,4	2,8	40	64
24 ^h	2760	2630	9,44	9,41	4	3,5	225	51
48 ^h	479	1060	8,68	9,02	-2,5	-1,3	(576)	(69)
72 ^h	526	1310	8,72	9,11	0,1	0,3	14400	4800
6 jours	186	709	8,26	8,85	-1,5	-0,8	(2900)	(1800)

CONCENTRATION M/30.000

MICROBES VISIBLES

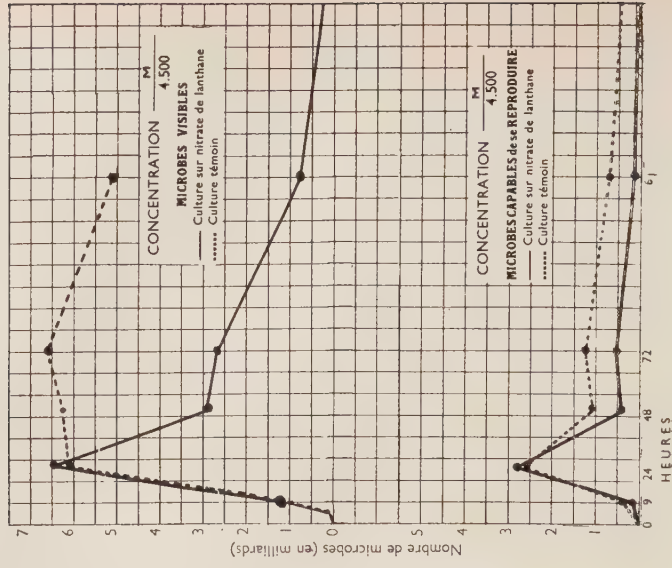
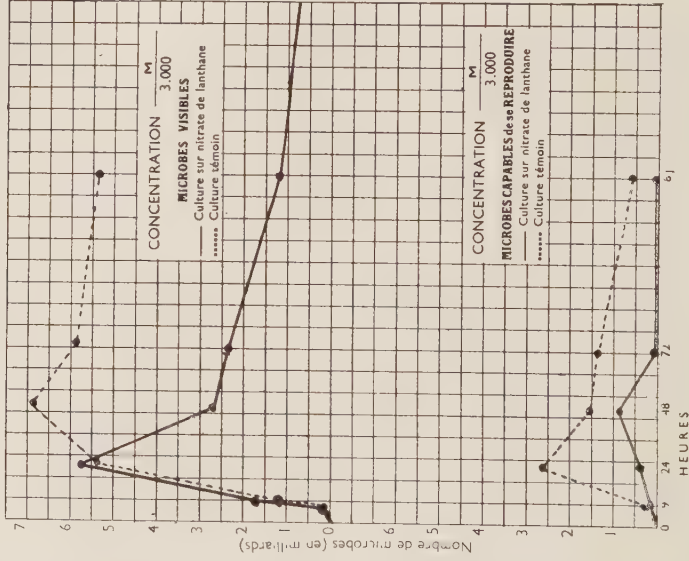
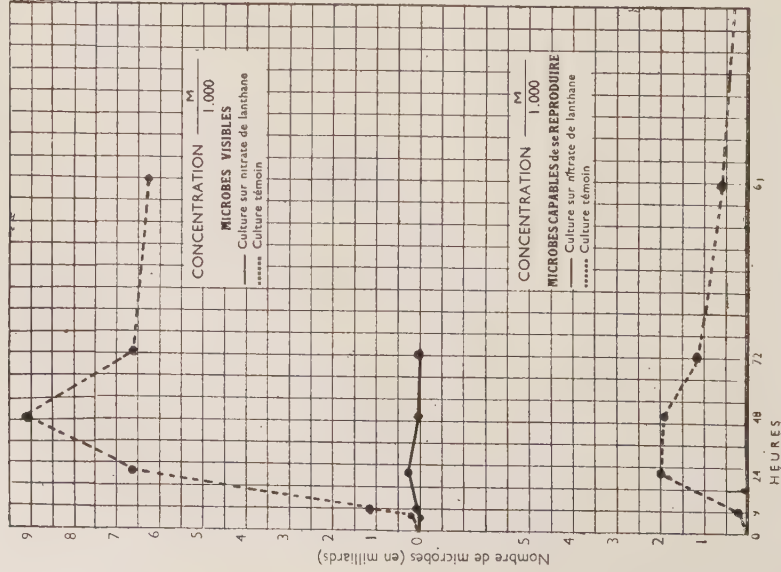
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATIONS (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 ^h	28	11,2	7,45	7,04	5,8	4,5	31	40
6 ^h	443,4	183,2	8,64	8,26	4	4	45	45
9 ^h	2423,9	1537,1	9,38	9,18	2,4	3	75	60
24 ^h	7832	5320,8	9,89	9,72	1,7	1,8	529	500
48 ^h	7981,2	8158,8	9,90	9,91	0,03	0,6	48000	2400
72 ^h	6621,4	7537,4	9,82	9,87	-0,02	-0,1	(7200)	(14400)
6 jours	7685,6	7390	9,88	9,86	0,02	-0,03	21600	(144000)

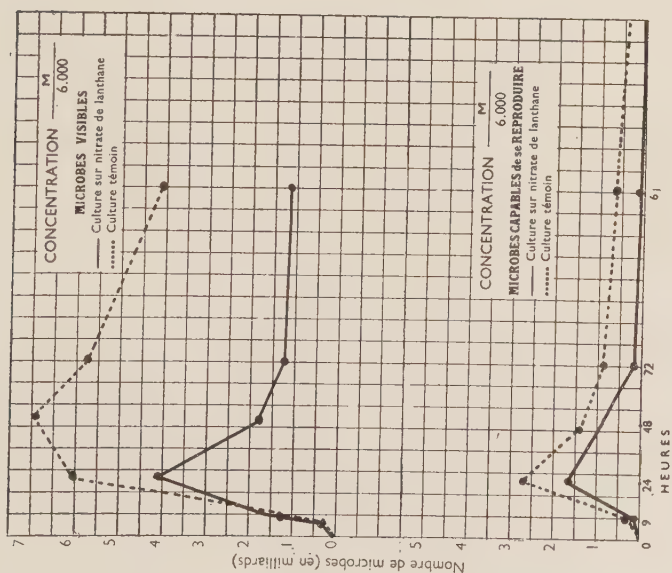
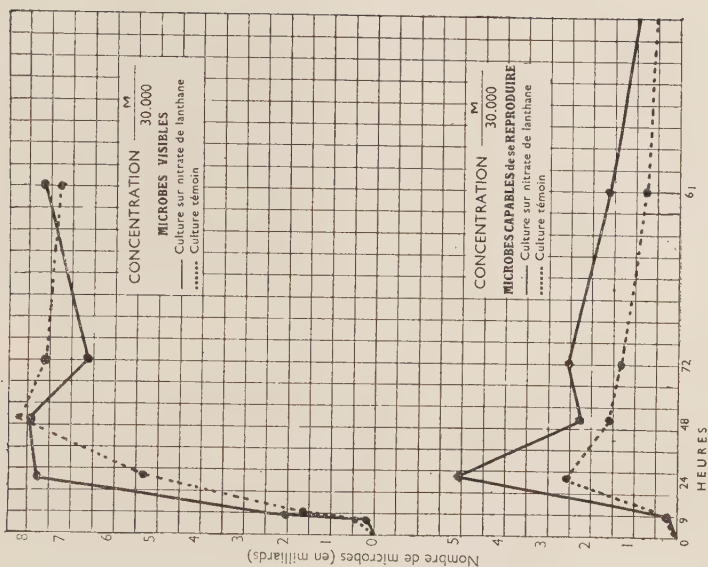
CONCENTRATION M/30.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

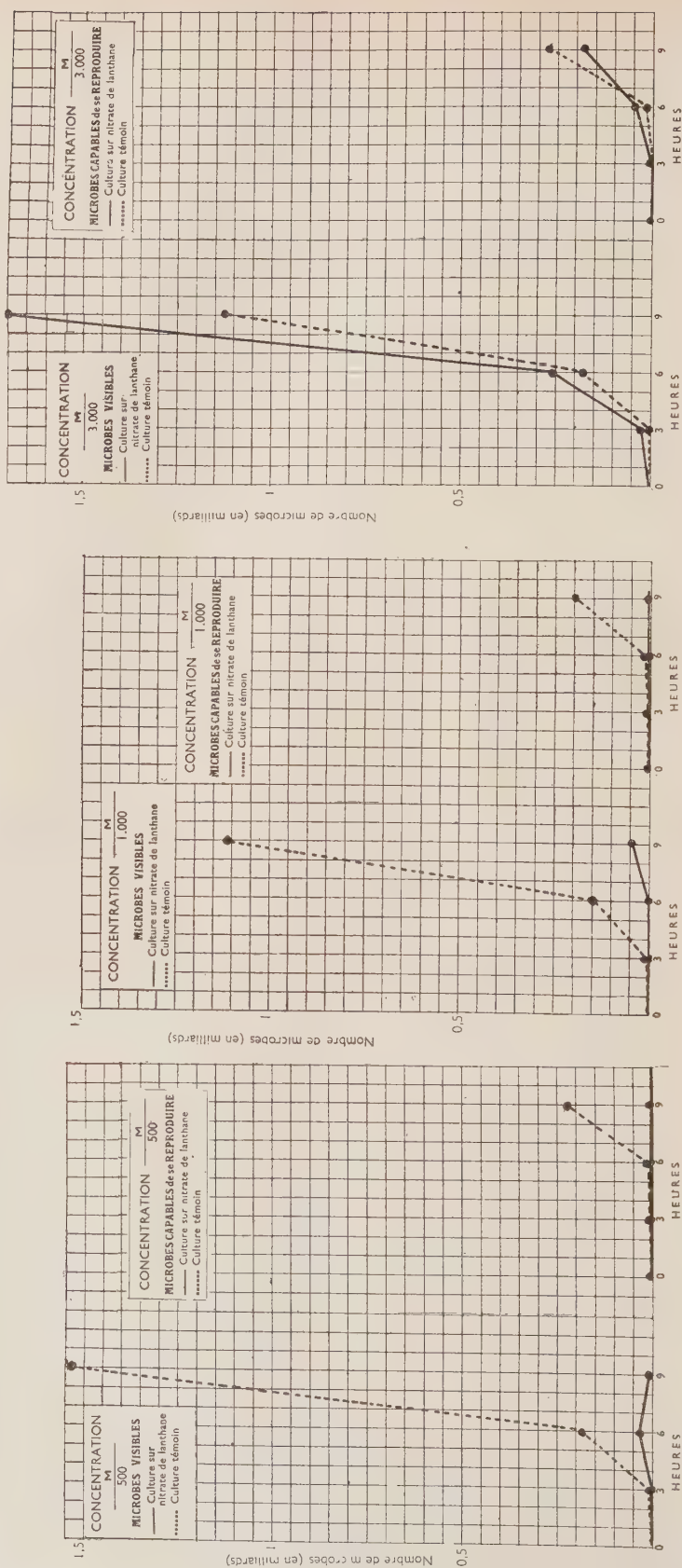
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATIONS (en minutes)	
	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin	Culture sur nitrate de lanthane	Culture témoin
0 ^h	0,350	0,343	5,54	5,43				
3 ^h	1,3	0,933	6,11	5,96	1,9	1,7	94	105
6 ^h	47,8	12,5	7,67	7,09	5,2	3,7	34	48
9 ^h	314	217	8,49	8,33	2,7	4	66	45
24 ^h	5030	2560	9,70	8,40	4	3,5	225	256
48 ^h	2230	1660	9,34	9,22	-1,2	-0,6	(1200)	(2600)
72 ^h	2513	1400	9,39	9,14	0,1	-0,2	14400	(7200)
6 jours	1573	746	9,19	8,87	-0,6	-0,9	(7200)	(4800)

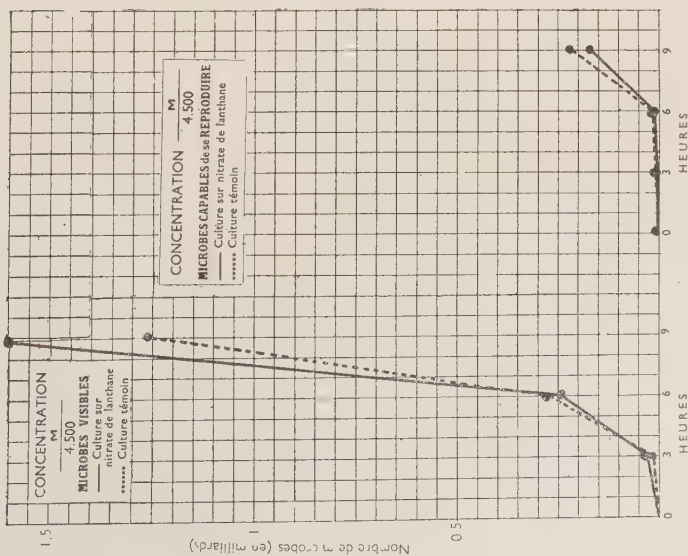
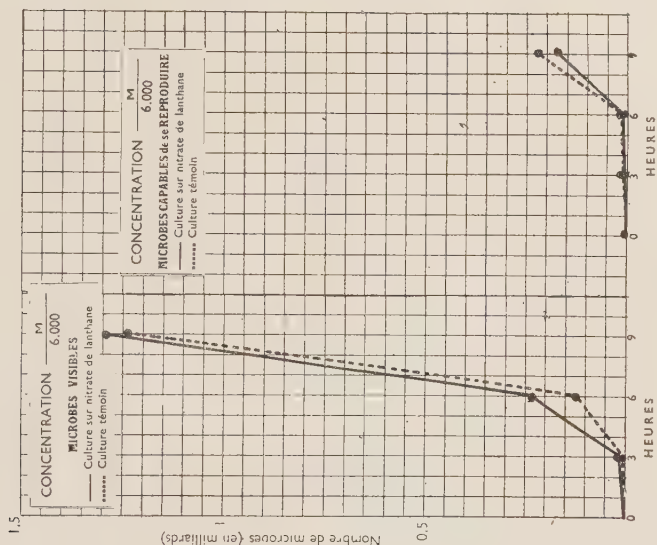
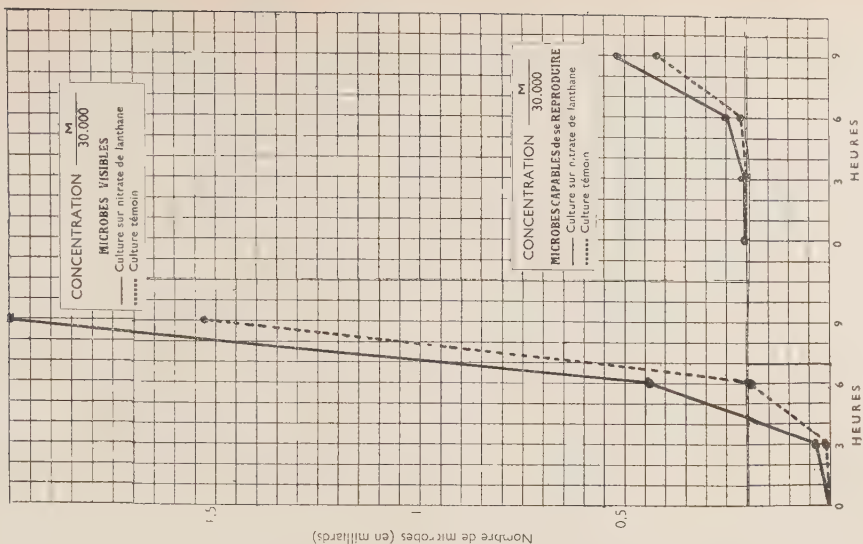
Courbes des nombres de Microbes en fonction du temps



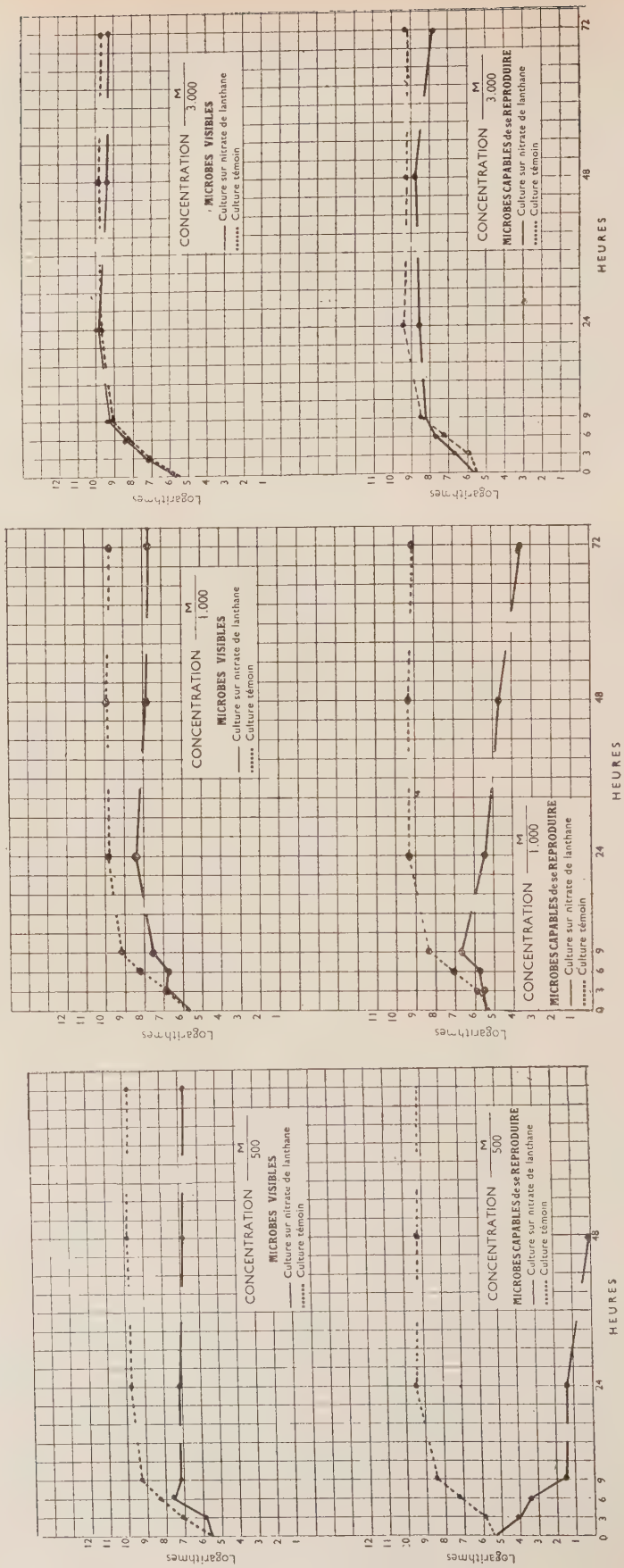


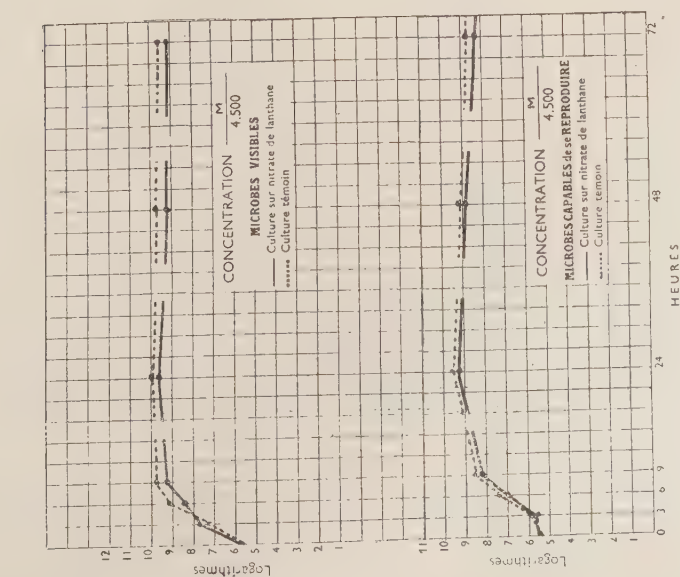
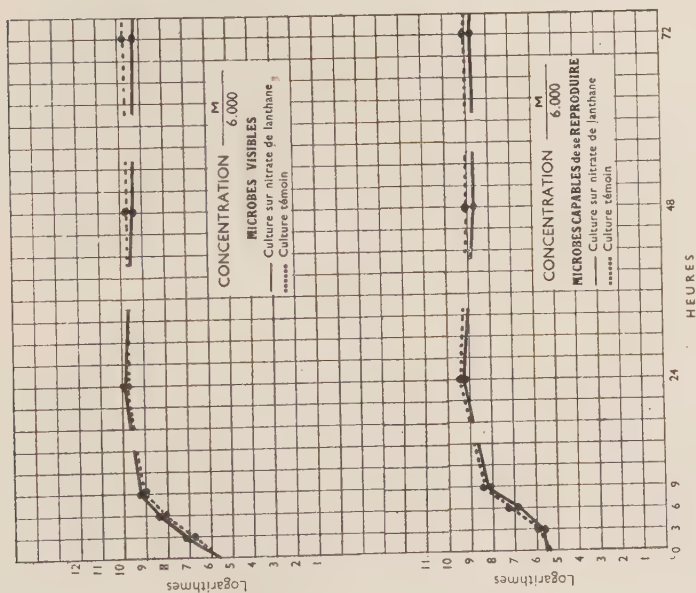
Courbes des nombres de Microbes en fonction du temps. (*Premières heures de la multiplication*).



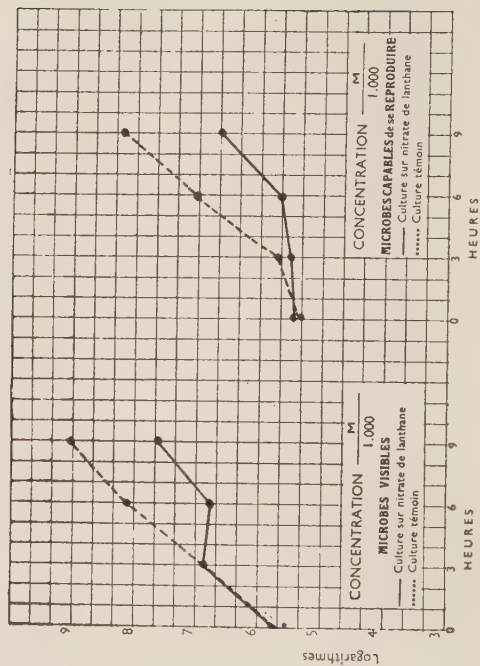
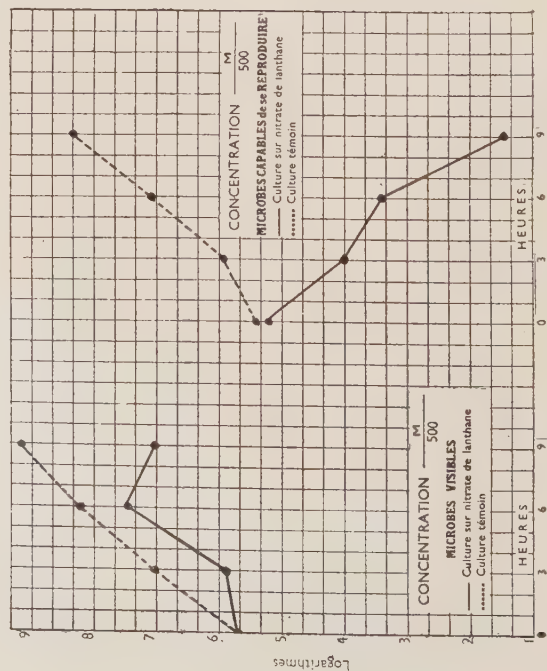


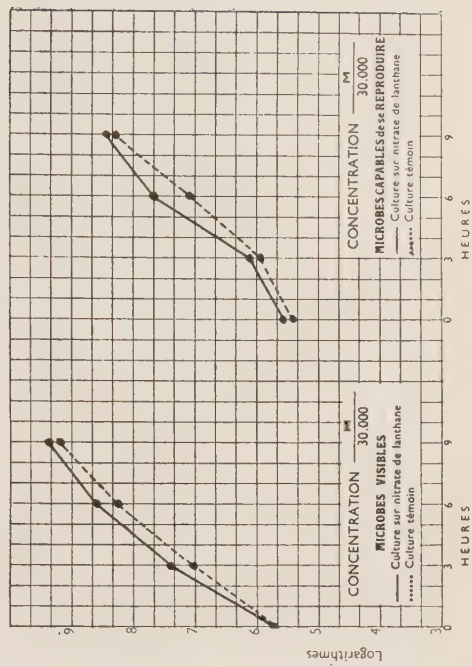
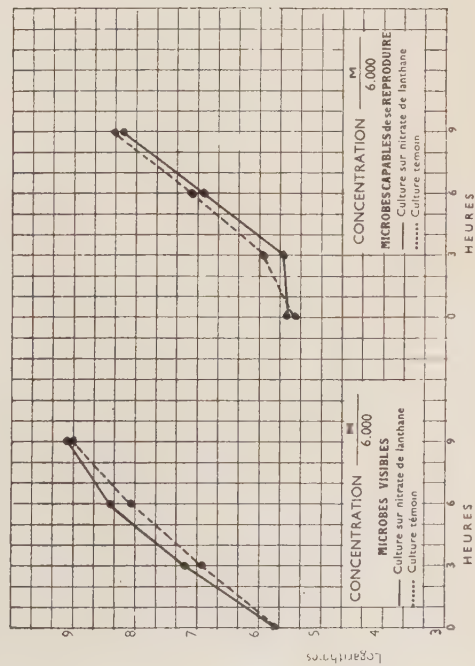
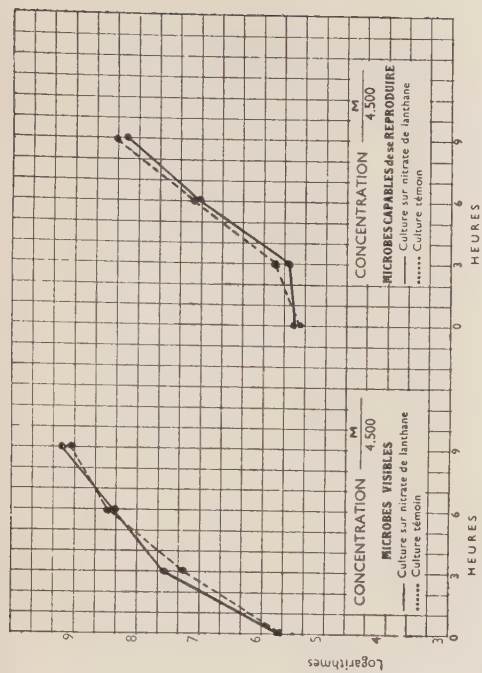
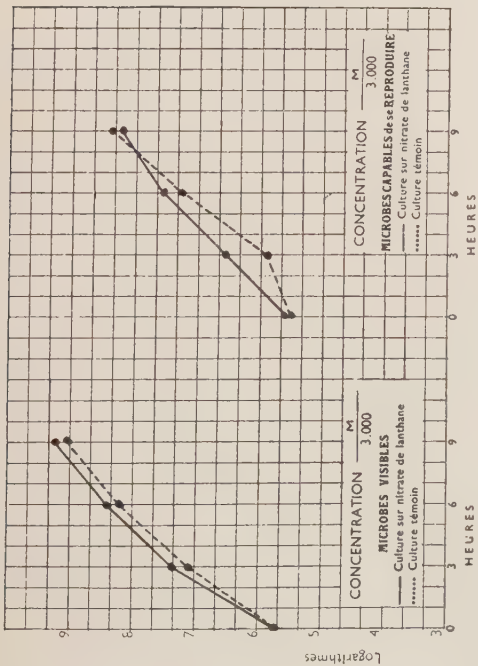
Courbes des logarithmes des nombres de Microbes en fonction du temps.



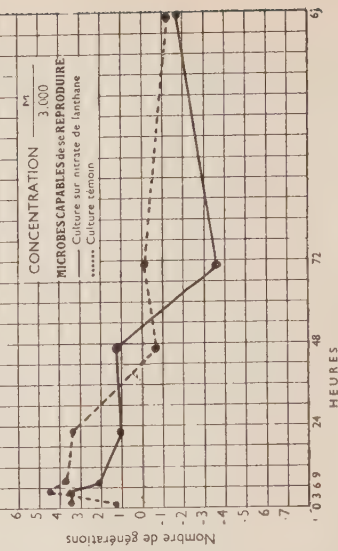
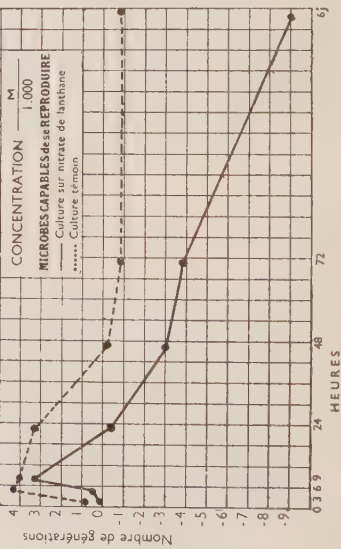
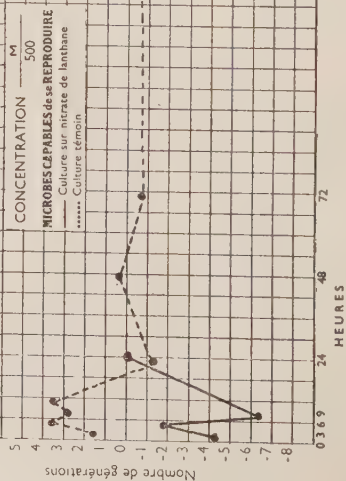
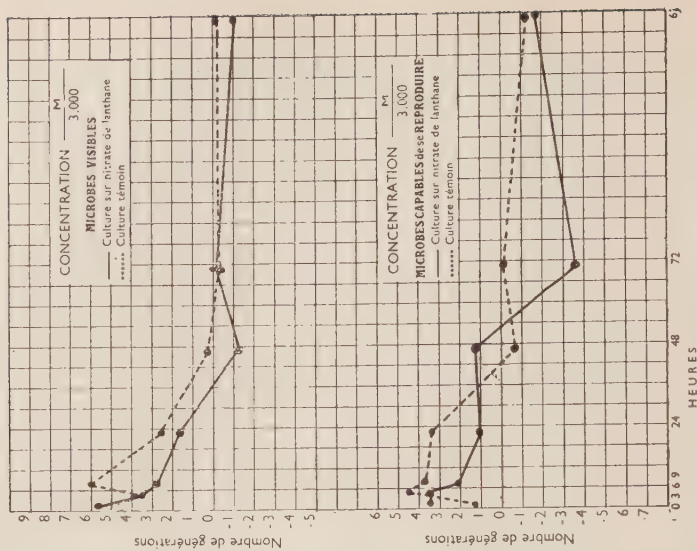
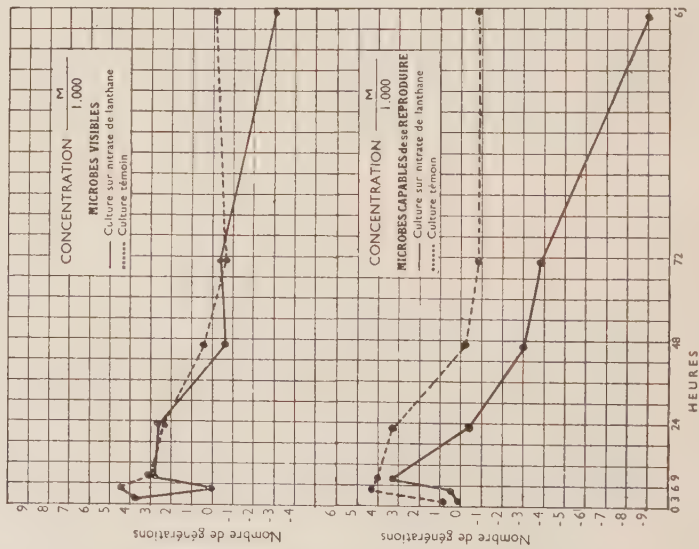
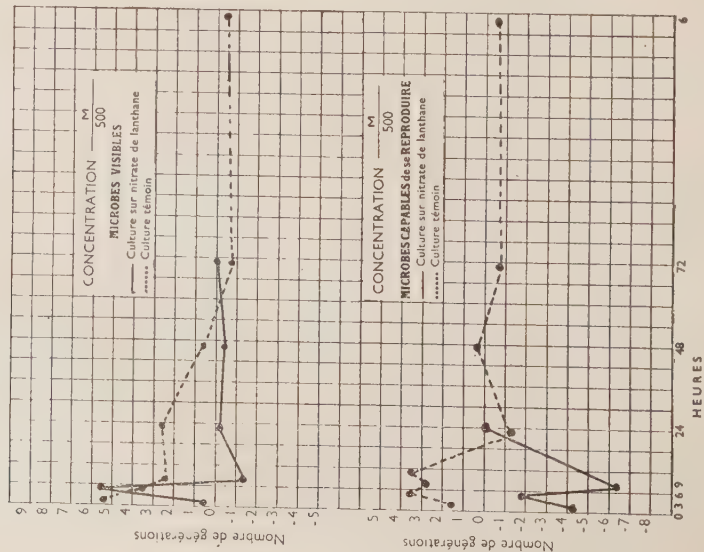


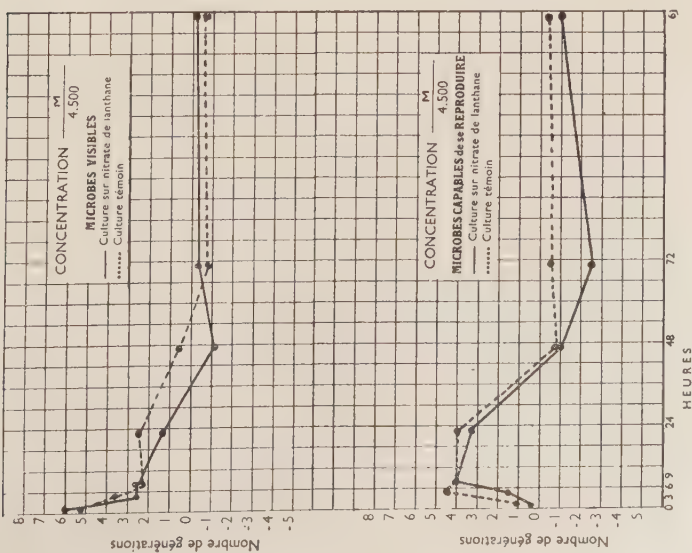
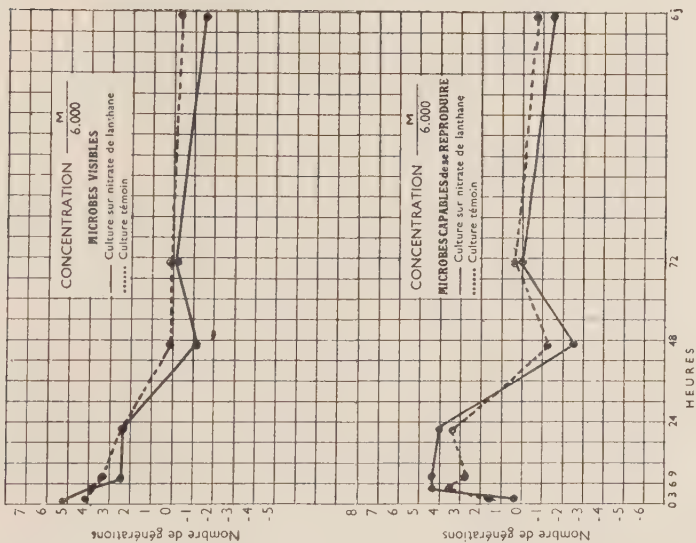
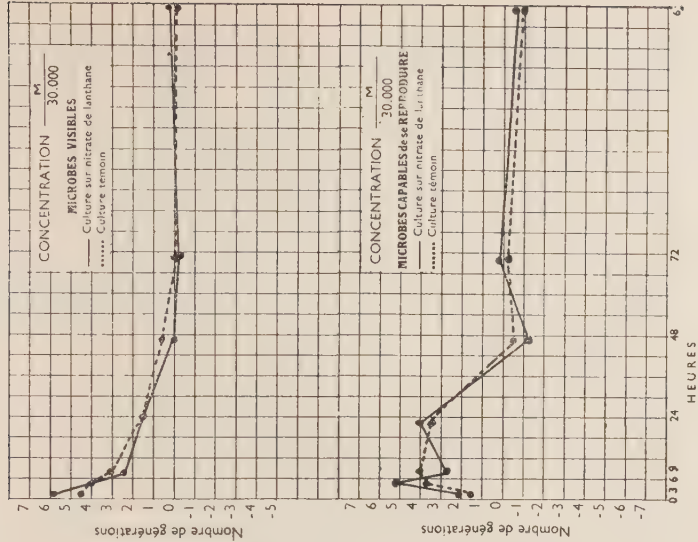
Courbes des logarithmes des nombres de Microbes en fonction du temps *(Premières heures de la multiplication)*



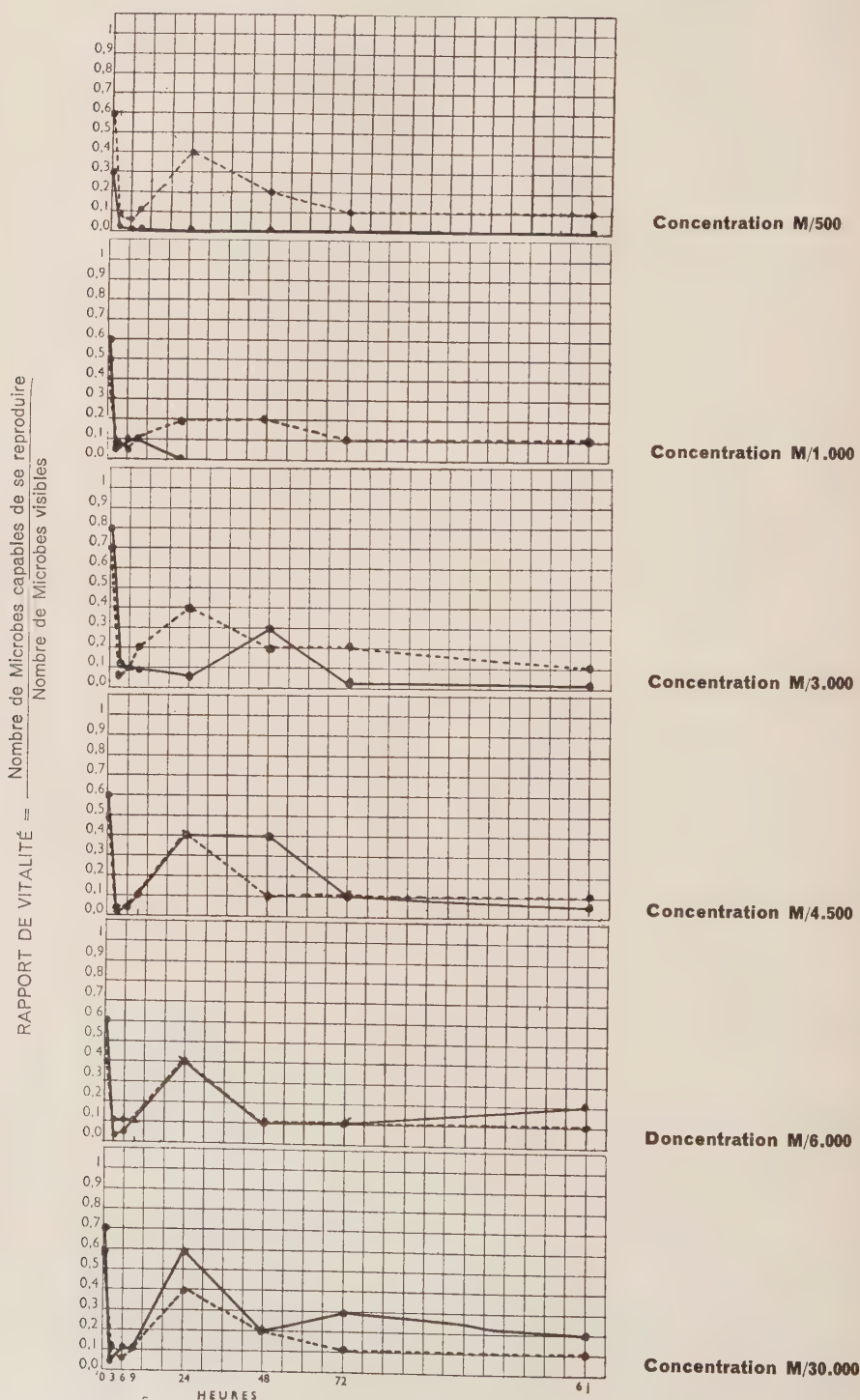


Courbes des nombres de Générations en fonction du temps.





Courbes des Rapports de vitalité en fonction du temps



II

ACTION DU NITRATE DE CÉRIUM

CONCENTRATION M/2.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	143.000	193.000
3 ^h	4.602.000	6.196.000	10.000	1.323.000
6 ^h	15.490.000	154.900.000	130.000	23.430.000
9 ^h	61.960.000	619.600.000	1.300.000	54.000.000
24 ^h	46.568.000	5.576.400.000	20.000	236.300.000
48 ^h	13.631.000	8.364.600.000	80	513.300.000
72 ^h	12.392.000	9.294.000.000	4	1.396.000.000
6 jours	10.223.400	5.204.640.000	10	1.062.000.000

CONCENTRATION M/4.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	176.000	200.000
3 ^h	3.598.000	7.710.000	260.000	450.000
6 ^h	22.400.000	51.400.000	300.000	5.830.000
9 ^h	82.240.000	1.002.300.000	2.000.000	106.600.000
24 ^h	1.259.300.000	4.112.000.000	14.300.000	3.700.000.000
48 ^h	1.387.800.000	6.425.000.000	385.000.000	3.113.000.000
72 ^h	231.300.000	5.911.000.000	119.000.000	1.763.000.000
6 jours		2.467.200.000	42.300.000	1.720.000.000

CONCENTRATION M/10.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	293.000	186.000
3 ^h	7.890.000	5.260.000	1.233.000	920.000
6 ^h	149.910.000	152.600.000	17.500.000	9.800.000
9 ^h	499.700.000	604.900.000	198.000.000	109.300.000
24 ^h	5.523.000.000	5.783.000.000	3.060.000.000	4.560.000.000
48 ^h	5.525.000.000	7.101.000.000	2.730.000.000	3.360.000.000
72 ^h	4.471.000.000	5.786.000.000	1.970.000.000	2.850.000.000
6 jours	1.578.000.000	7.364.000.000	596.000.000	470.000.000

CONCENTRATION M/20.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	253.000	186.000
3 ^h	10.520.000	5.260.000	1.250.000	920.000
6 ^h	176.210.000	152.600.000	23.130.000	9.800.000
9 ^h	368.200.000	604.900.000	217.000.000	109.300.000
24 ^h	5.260.000.000	5.783.000.000	3.660.000.000	4.560.000.000
48 ^h	5.470.000.000	7.101.000.000	2.060.000.000	3.360.000.000
72 ^h	7.101.000.000	5.786.000.000	1.210.000.000	2.850.000.000
6 jours	3.682.000.000	7.364.000.000	530.000.000	470.000.000

CONCENTRATION M/40.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	266.000	226.000
3 ^h	5.320.000	5.852.000	536.000	383.000
6 ^h	212.800.000	53.200.000	9.400.000	7.660.000
9 ^h	399.000.000	234.080.000	79.000.000	38.300.000
24 ^h	7.674.000.000	8.512.000.000	5.760.000.000	5.230.000.000
48 ^h	3.458.000.000	4.256.000.000	1.960.000.000	2.660.000.000
72 ^h	3.724.000.000	3.458.000.000	680.000.000	1.130.000.000
6 jours			500.000.000	166.000.000

CONCENTRATION M/100.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	306.000	226.000
3 ^h	5.320.000	5.852.000	1.026.000	383.000
6 ^h	123.000.000	53.200.000	80.600.000	7.660.000
9 ^h	399.000.000	234.080.000	139.300.000	38.300.000
24 ^h	10.640.000.000	8.512.000.000	8.100.000.000	5.230.000.000
48 ^h	8.778.000.000	4.256.000.000	7.930.000.000	2.660.000.000
72 ^h	3.990.000.000	3.458.000.000	926.000.000	1.130.000.000
6 jours	1.400.000.000		660.000.000	166.000.000

CONCENTRATION M/2.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 ^h	4,6	6,1	6,66	6,79	3	3,6	60	50
6 ^h	15,4	154,9	7,18	8,18	1,7	4,6	107	39
9 ^h	61,9	619,6	7,79	8,79	2	2	90	90
24 ^h	49,5	5576,4	7,69	9,74	-0,3	3	(3000)	300
48 ^h	13,6	8364,6	7,13	9,92	-1,8	0,6	(800)	2600
72 ^h	12,3	9294	7,08	9,96	-0,1	0,1	(14400)	14400
6 jours	10,2	5204	7,00	9,71	-0,2	-0,8	(26600)	(5400)

CONCENTRATION M/2.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	0.143	0,193	5,14	5,28				
3 ^h	0,01	1,3	4,00	6,12	-3,8	2,8	(47)	65
6 ^h	0,130	23,4	5,11	7,36	3,7	4	48	45
9 ^h	1,3	54	6,11	7,73	3	1.2	60	150
24 ^h	0,02	236,3	4,30	8,37	-6	2,4	(150)	375
48 ^h	0	513,3	1,90	8,71	-8	1	(180)	1440
72 ^h	0	1396	0,60	9,14	-4,3	1,4	(328)	1025
6 jours	0	1062	1,00	9,02	-1,3	-0,4	4090	(10800)

CONCENTRATION M/4.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	3,5	7,7	6,55	6,88	2,8	4	64	45
6 h	22,4	51,4	7,35	7,71	2,6	2,7	69	66
9 h	82,2	1002,3	7,91	9	1,8	4,3	100	41
24 h	1259,3	4112	9,09	9,61	9,9	0,2	90	4500
48 h	1387,8	6425	9,13	9,73	0,1	0,4	14400	2600
72 h	231,3	5911	8,36	9,77	-2,5	0,1	(576)	14400
6 jours		2467,2		9,39		-1,2		(3600)

CONCENTRATION M/4.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 h	0,176	0,200	5,24	5,30	0,5	1	360	180
3 h	0,260	0,450	5,41	5,65	0,2	3,7	900	42
6 h	0,300	5,8	5,47	6,76	2,7	4	66	45
9 h	2	106,6	6,30	8,02	2,8	5	321	180
24 h	14,3	3700	7,15	9,56	4	-0,2	360	(7200)
48 h	385	3113	8,58	9,49	-1,7	-0,8	(845)	(1800)
72 h	119	1763	8,07	0,24	-1,5	-0,03	(281)	(144000)
6 jours	42,3	1720	7,62	9,23				

CONCENTRATION M/10.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69	4	3,7	45	48
3 ^h	7,8	5,2	6,89	6,72	4	4,5	45	37
6 ^h	149,9	152,6	8,17	8,18	1,7	2	105	90
9 ^h	499,7	604,9	8,69	8,78	3	3,2	300	281
24 ^h	5523	5783	9,74	9,76	0	0,3		4800
48 ^h	5523	7101	9,74	9,85	-0,3	-0,3	(4800)	(4800)
72 ^h	4471	5786	9,65	9,76	-1,5	0,3	(287)	14400
6 jours	1578	7364	9,19	9,86				

CONCENTRATION M/10.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	0,293	0,186	5,46	5,26	2	2,3	90	78
3 ^h	1,2	0,920	6,08	5,96	3,8	3,7	47	48
6 ^h	17,5	9,8	7,24	6,99	3,8	3,8	47	47
9 ^h	198	109,3	8,29	8,03	4	5,4	225	166
24 ^h	3060	4560	9,48	9,65	-0,1	-1	(14400)	(1440)
48 ^h	2730	3360	9,43	9,52	-0,4	-0,2	(3600)	(720)
72 ^h	1970	2850	9,29	9,45	-1,7	-2,6	(2541)	(1661)
6 jours	596	470	8,77	8,67				

CONCENTRATION M/20.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 ^h	10,5	5,2	7,02	6,72	4,4	3,7	40	48
6 ^h	176,2	152,6	8,24	8,18	4	4,8	45	37
9 ^h	368,2	604,9	8,56	8,78	1	2	180	90
24 ^h	5260	5782	9,72	9,76	3,8	3,2	238	281
48 ^h	5470	7101	9,73	9,85	0,03	0,3	48000	4800
72 ^h	7101	5786	9,85	9,76	0,4	-0,3	3600	(4800)
6 jours	3682	7364	9,56	9,86	-0,1	0,3	(43200)	14400

CONCENTRATION M/20.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	0,253	0,186	5,40	5,26				
3 ^h	1,2	0,920	6,09	5,96	2,3	2,3	78	78
6 ^h	23,1	9,8	7,36	6,99	4	3,7	45	48
9 ^h	217,6	109,3	8,33	8,03	3,2	3,8	56	47
24 ^h	3660	4560	9,56	9,65	4	5,4	226	166
48 ^h	2060	3360	9,31	9,52	-0,8	-1	(1800)	(1440)
72 ^h	1210	2850	9,07	9,45	-0,8	-0,2	(1800)	(720)
6 jours	530	470	8,72	8,67	-1	-2,6	(4320)	(1661)

CONCENTRATION M/40.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 ^h	5,3	5,8	6,72	6,76	3,4	3,5	52	48
6 ^h	212,8	53,2	8,32	7,72	5,3	3	33	60
9 ^h	399	234	8,60	8,36	0,9	2	200	90
24 ^h	7674	8512	9,88	9,92	0,9	5	1000	180
48 ^h	3458	4256	9,53	9,62	-1	-1	(1440)	(1440)
72 ^h	3724	3458	9,57	9,53	0,1	-0,3	14400	(4800)
6 jours								

CONCENTRATION M/40.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 ^h	0,266	0,226	5,42	5,35				
3 ^h	0,536	0,383	5,72	5,58	1	0,7	180	257
6 ^h	9,4	7,6	6,97	6,88	4	4,3	45	41
9 ^h	79	38,3	7,89	7,58	3	2	60	90
24 ^h	5760	5230	9,76	9,71	6	7	150	128
48 ^h	1960	2660	9,29	9,42	-1,5	-1	(960)	(1440)
72 ^h	680	1130	8,88	9,05	-1,5	-1	(960)	(1440)
6 jours	500	166	8,69	8,22	-0,4	-2,7	(10800)	(1600)

CONCENTRATION M/100.000

MICROBES VISIBLES

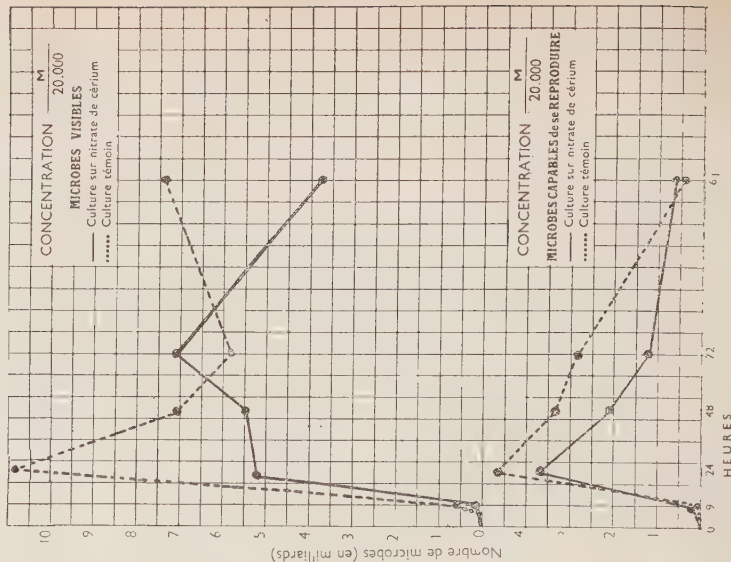
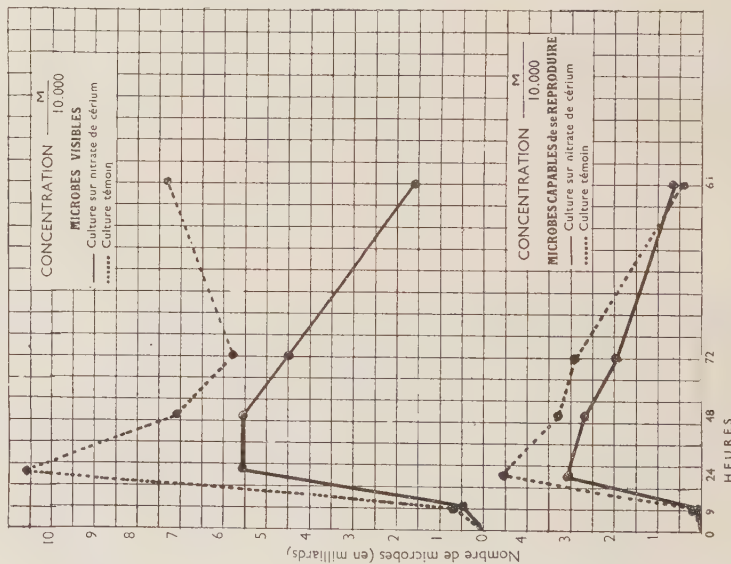
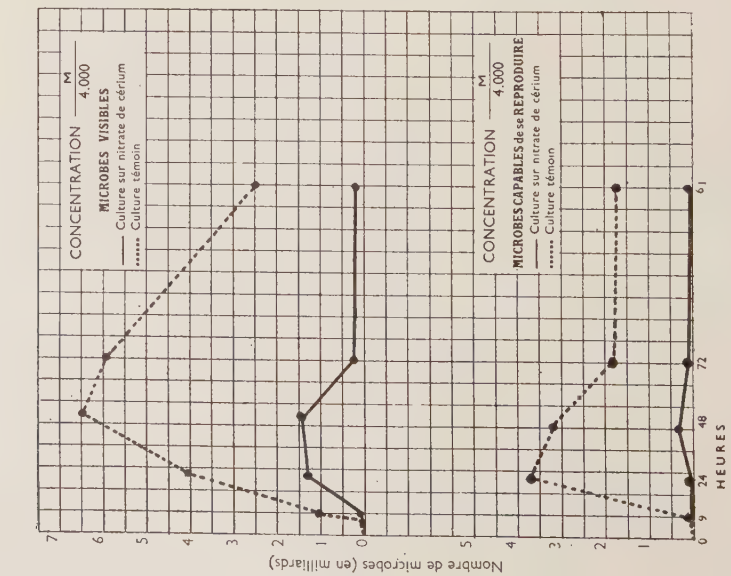
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	5,3	5,8	6,72	6,76	3,4	3,5	52	48
6 :	123	53,2	8,08	7,72	4,5	3	40	60
9 h	399	234	8,60	8,36	1,4	2	135	90
24 h	10640	8512	10,02	9,92	4,7	5	191	180
48 h	8778	4256	9,94	9,62	-3,6	-1	(400)	(1440)
72 h	3990	3458	9,60	9,53	-1	-0,3	(1440)	(4800)
6 jours	1400		9,14		-1,5		(2880)	

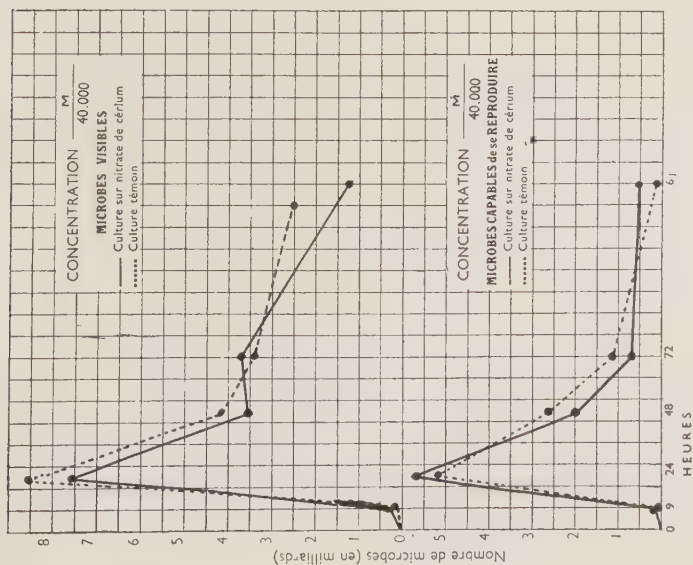
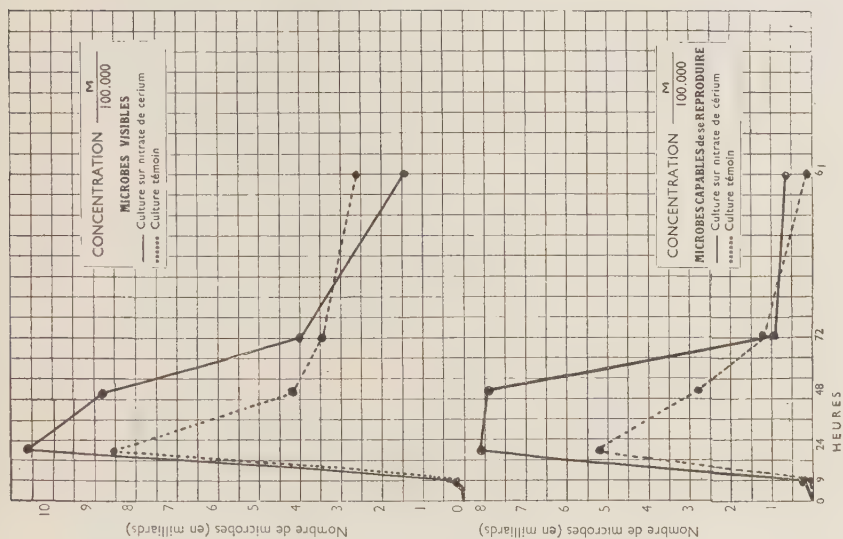
CONCENTRATION M/100.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

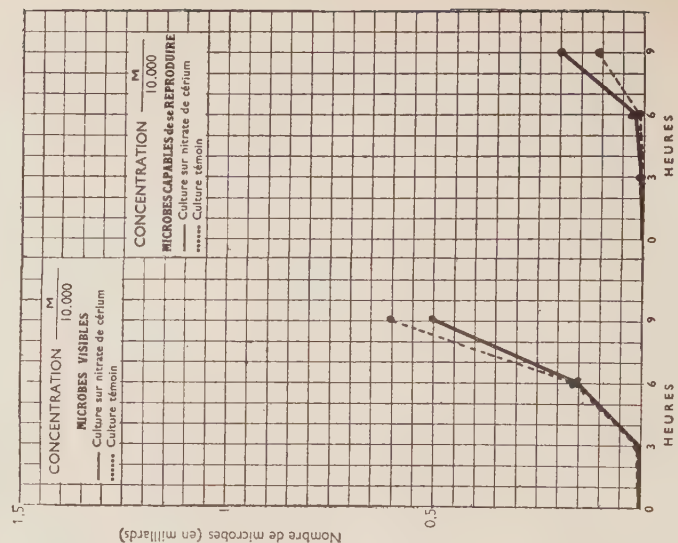
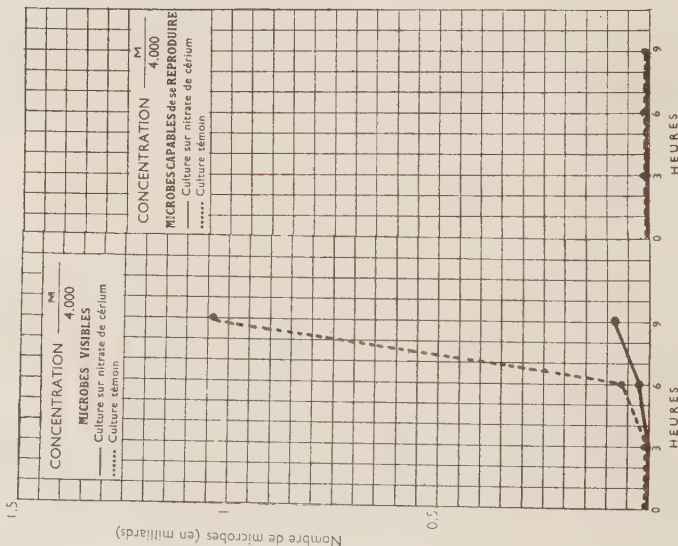
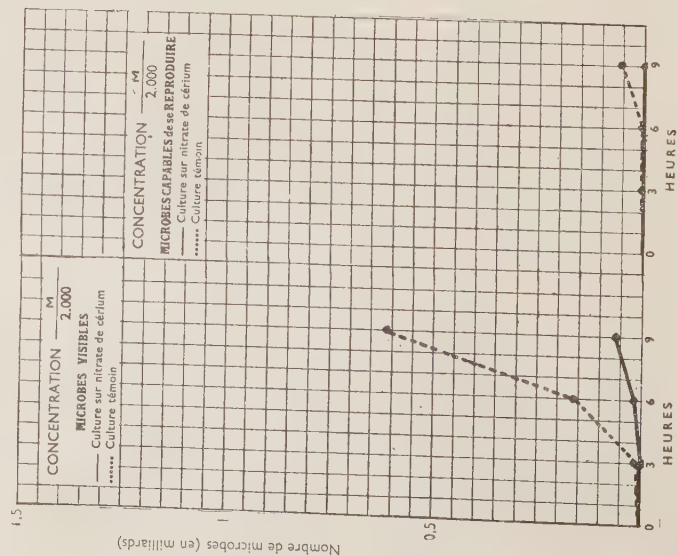
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin	Culture sur nitrate de cérium	Culture témoin
0 h	0,306	0,226	5,48	5,35				
3 h	1,02	0,383	6	5,58	1,7	0,7	105	257
6 h	80,6	7,6	7,90	6,88	6,3	4,3	28	41
9 h	139,3	38,3	8,14	7,58	0,8	2	225	90
24 h	8100	5230	9,90	9,71	5,8	7	155	128
48 h	7930	2660	9,89	9,42	-0,03	-1	(4800)	(1440)
72 h	926	1130	8,96	9,05	-3	-1	(480)	(1440)
6 jours	660	166	8,81	8,22	-0,5	-2,7	(8640)	(1600)

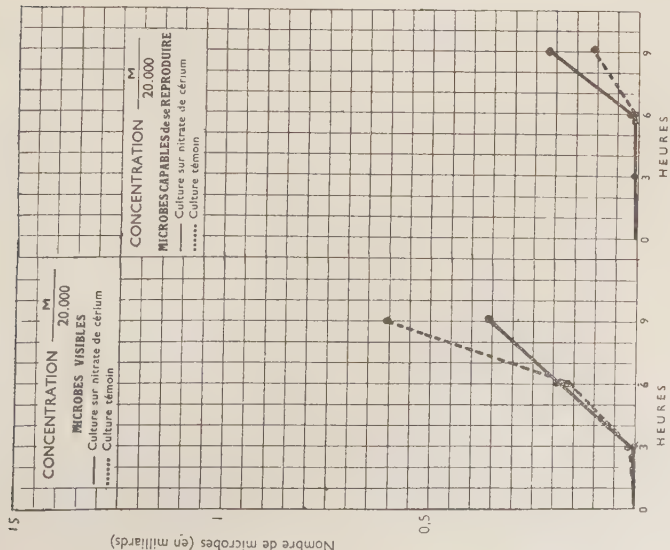
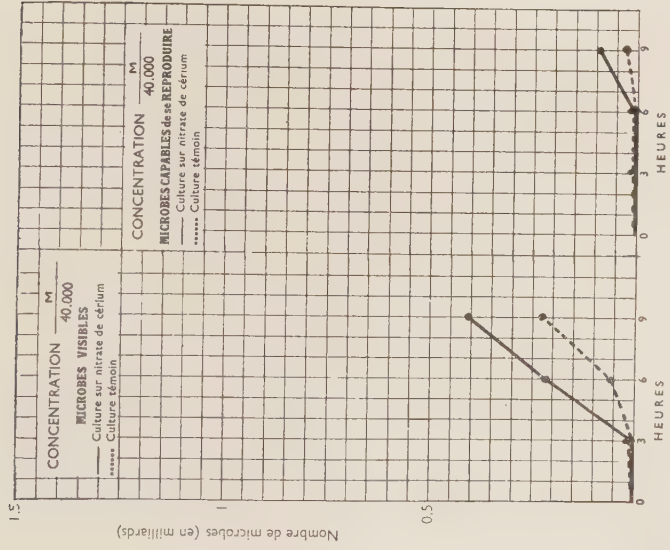
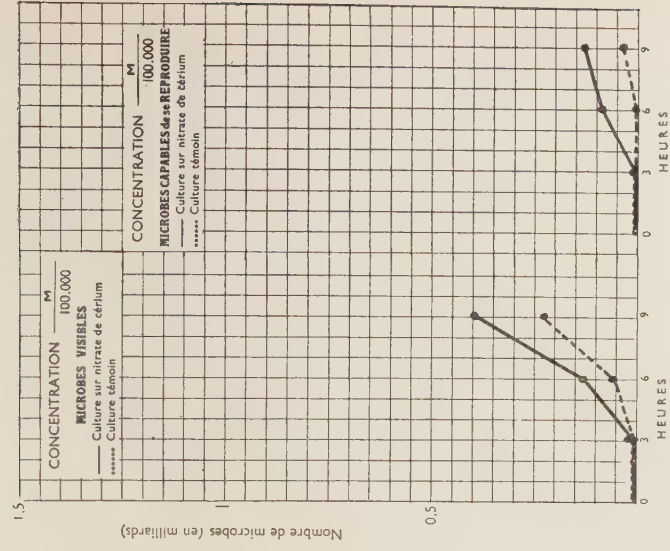
Courbes des nombres de Microbes en fonction du temps.



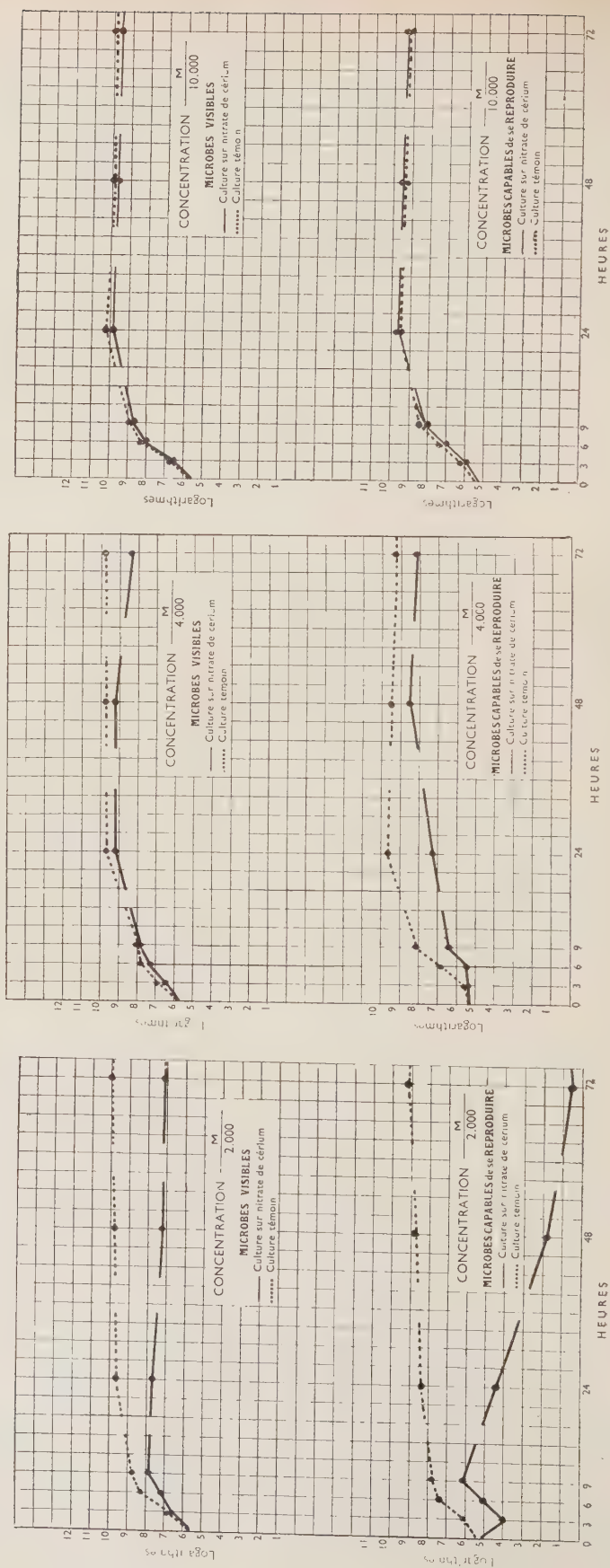


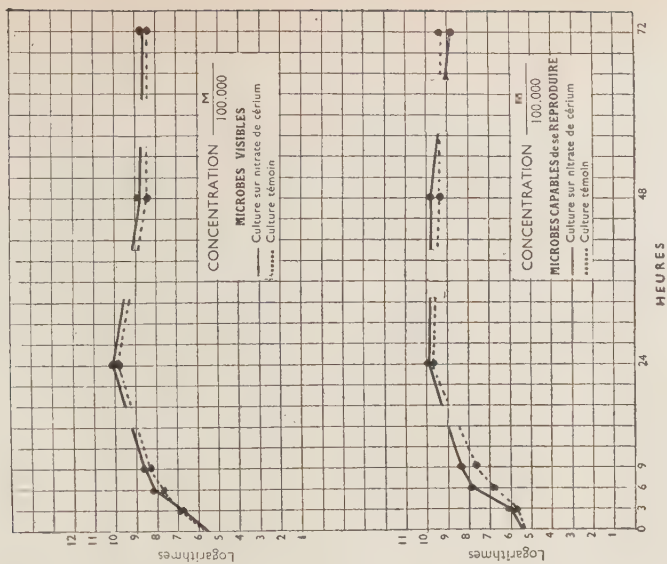
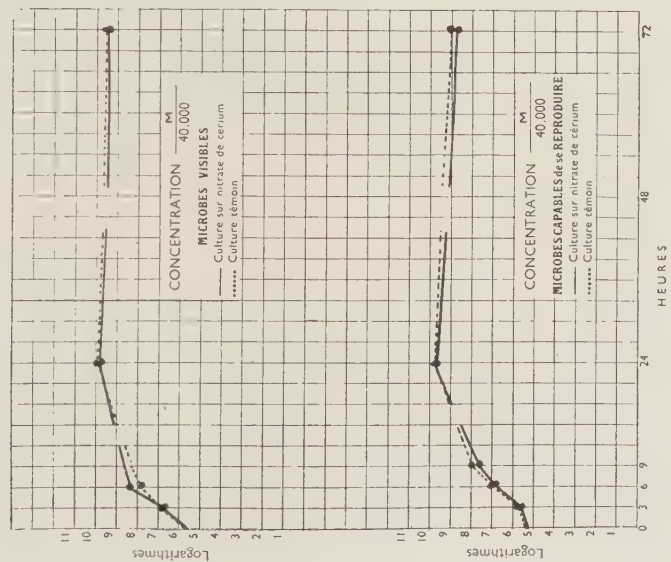
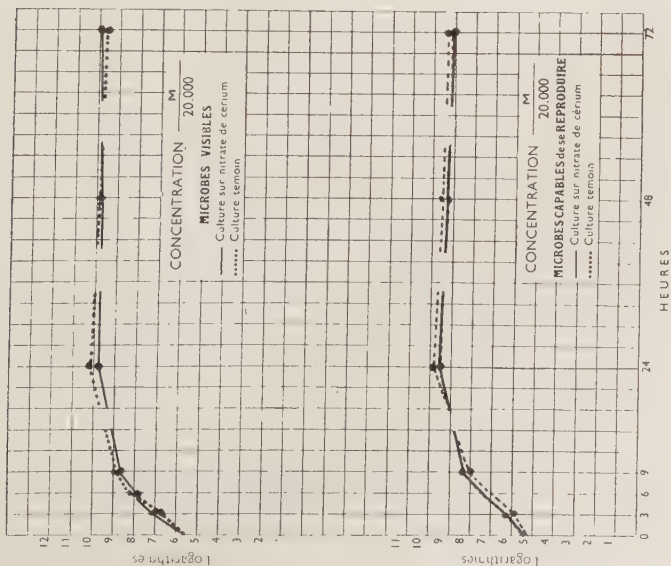
Courbes des nombres de Microbes en fonction du temps. (Premières heures de la multiplication).



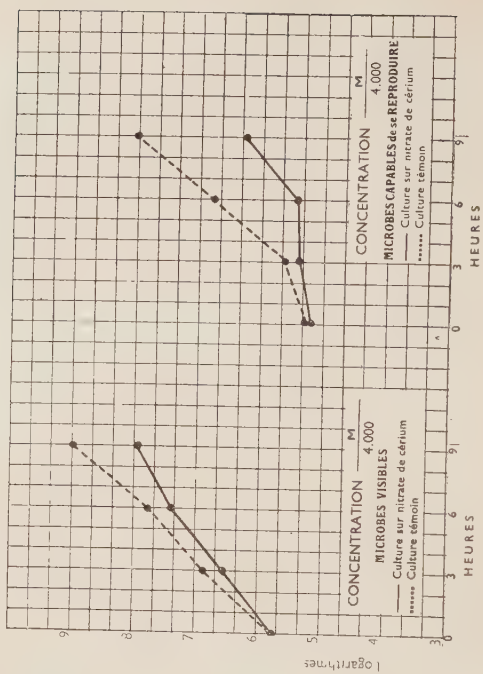
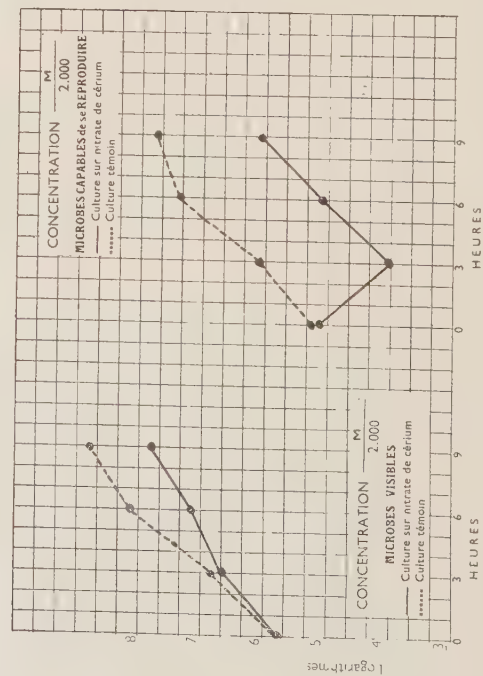


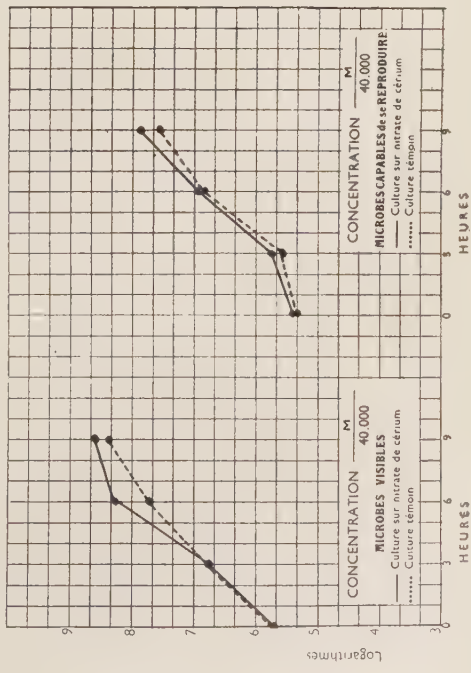
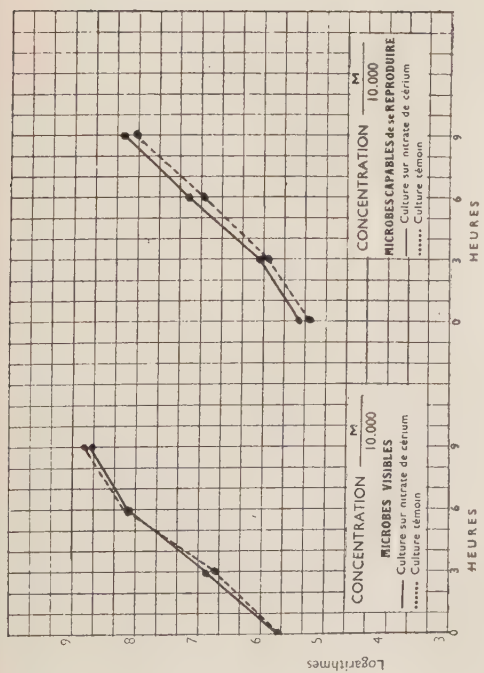
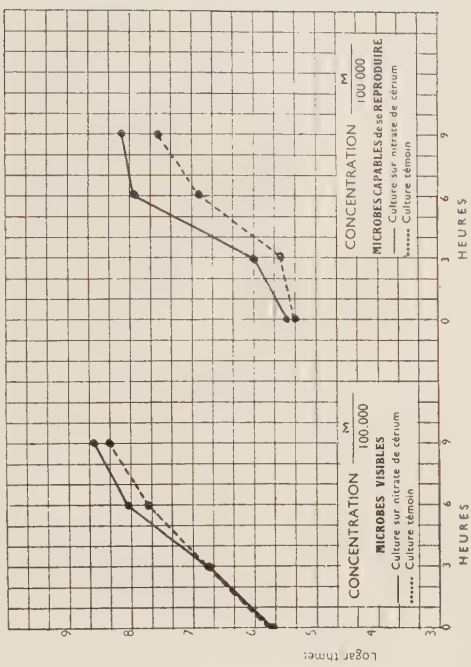
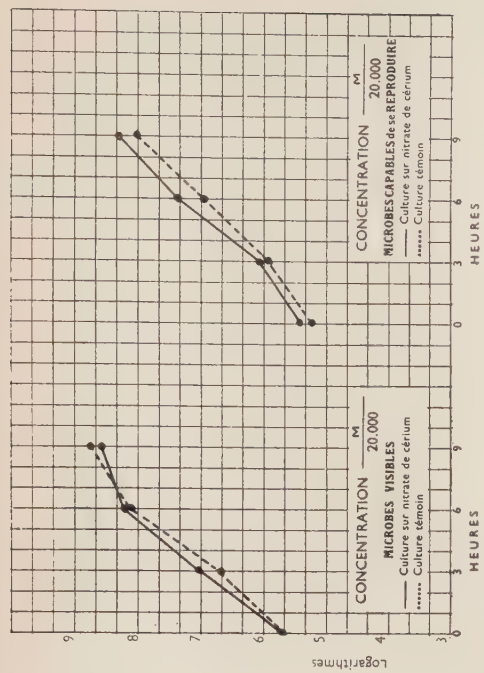
Courbes des logarithmes des nombres de Microbes en fonction du temps.



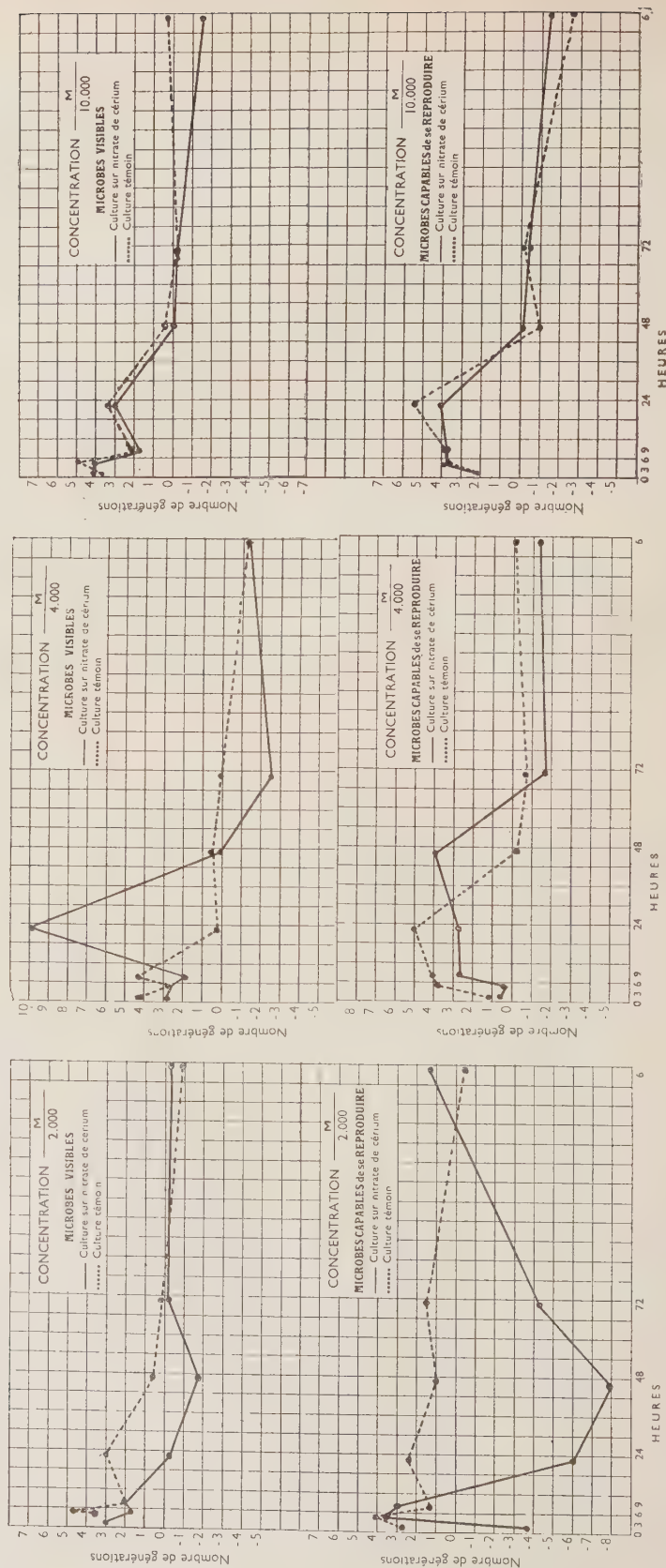


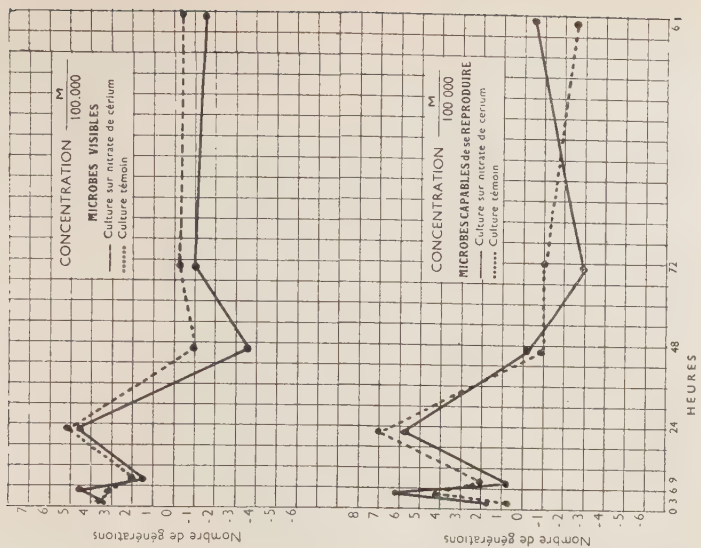
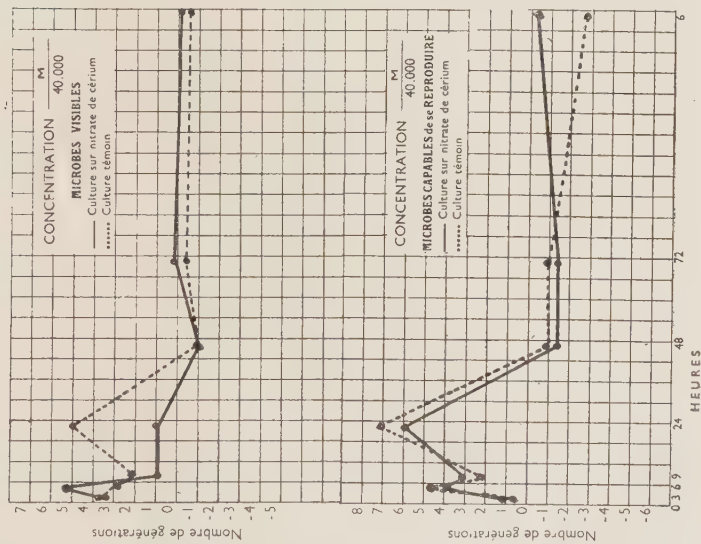
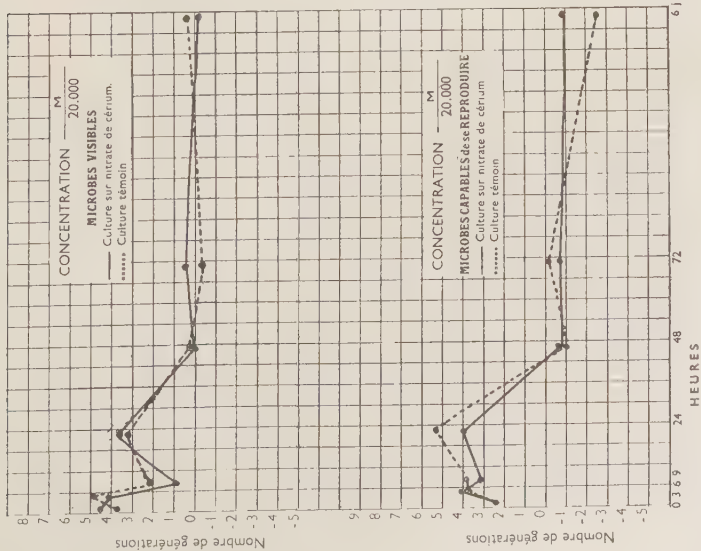
Courbes des logarithmes des nombres de Microbes en fonction du temps *(Premières heures de la multiplication)*





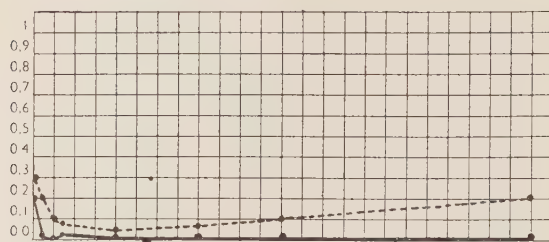
Courbes des nombres de Générations en fonction du temps.



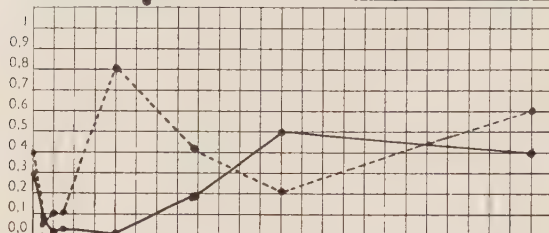


Courbes des Rapports de vitalité en fonction du temps

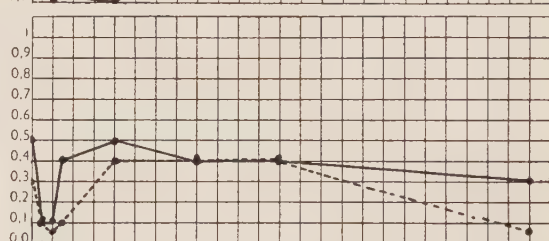
RAPPORT DE VITALITÉ = $\frac{\text{Nombre de Microbes capables de se reproduire}}{\text{Nombre de Microbes visibles}}$



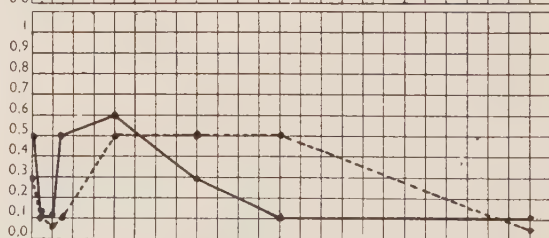
Concentration M/2.000



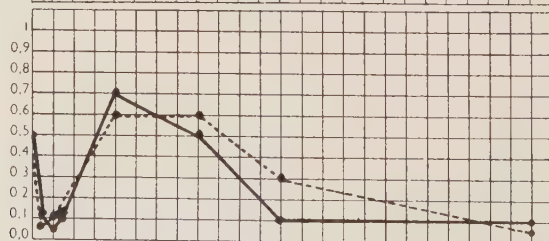
Concentration M/4.000



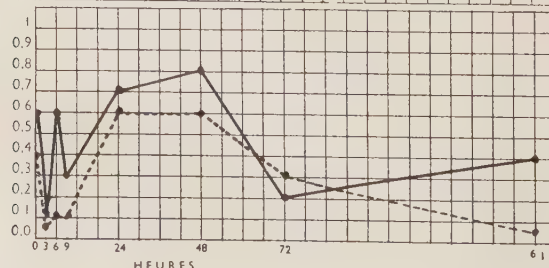
Concentration M/.10000



Concentration M/20.000



Concentration M/40.000



Concentration M/100.000

HEURES

III
ACTION DU NITRATE
DE PLOMB

CONCENTRATION M/2.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	243.000	336.000
3 ^h	2.612.000	10.448.000	96.600	886.000
6 ^h	4.440.000	92.726.000	16.000	4.100.000
9 ^h	47.016.000	339.560.000	6.000	164.600.000
24 ^h	78.360.000	2.230.200.000	80.000	2.220.000.000
48 ^h	914.200.000	3.918.000.000	98.000.000	2.000.000.000
72 ^h	940.320.000	1.371.000.000	229.600.000	343.000.000
6 jours	744.420.000	946.440.000	186.600.000	

CONCENTRATION M/5.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	203.000	276.000
3 ^h	2.612.000	3.918.000	136.000	383.000
6 ^h	3.265.000	60.076.000	156.000	2.640.000
9 ^h	11.754.000	229.856.000	270.000	5.673.000
24 ^h	79.666.000	2.389.980.000	963.000	2.030.000.000
48 ^h	1.750.040.000	2.660.000.000	119.600.000	1.780.220.000
72 ^h	2.612.000.000	1.736.980.000	833.000.000	820.000.000
6 jours	1.175.000.000	220.020.000	533.000.000	213.000.000

CONCENTRATION M/10.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	223.000	346.000
3 ^h	5.530.000	8.295.000	383.000	710.000
6 ^h	11.060.000	49.770.000	3.400.000	9.030.000
9 ^h	52.535.000	331.800.000	29.300.000	81.300.000
24 ^u	2.046.100.000	3.318.000.099	84.600.000	2.060.000.000
48 ^h	1.354.850.000	5.253.500.000	730.000.000	1.430.000.000
72 ^h	276.500.000	2.101.400.000	200.000.000	1.166.000.000
6 jours	207.375.000	525.350.000		80.000.000

CONCENTRATION M/50.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	266.000	336.000
3 ^h	24.814.000	10.448.000	263.000	886.000
6 ^h	27.426.000	92.726.000	7.100.000	4.100.000
9 ^h	378.740.000	339.560.000	53.600.000	164.600.000
24 ^h	3.619.440.000	2.230.200.000	3.060.000.000	2.220.000.000
48 ^h	5.093.400.000	3.918.000.000	1.660.000.000	2.000.000.000
72 ^h	2.015.000.000	1.371.000.000	386.000.000	340.000.000
6 jours	1.175.000.000	946.000.000	206.000.000	220.000.000

CONCENTRATION M/100.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	296.000	410.000
3 ^h	13.548.000	11.060.000	603.000	1.046.000
6 ^h	160.370.000	106.452.000	13.760.000	30.260.000
9 ^h	345.625.000	246.085.000	68.000.000	101.000.000
24 ^h	5.612.950.000	3.318.000.000	2.930.000.000	2.500.000.000
48 ^h	3.981.600.000	3.318.000.000	1.000.000.000	851.730.000
72 ^h	1.659.000.000	2.765.000.000	696.000.000	333.000.000
6 jours	1.232.000.000	1.539.000.000	373.000.000	193.000.000

CONCENTRATION M/1.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	386.000	410.000
3 ^h	35.945.000	11.060.000	1.546.000	1.046.000
6 ^h	282.030.000	106.452.500	39.600.000	30.260.000
9 ^h	337.330.000	246.085.000	159.000.000	101.000.000
24 ^h	6.912.500.000	3.318.000.000	3.460.000.000	2.500.000.000
48 ^h	2.903.250.000	3.318.000.000	1.530.000.000	851.730.000
72 ^h	1.935.000.000	2.765.000.000	550.000.000	333.000.000
6 jours	1.390.000.000	1.539.000.000	206.000.000	193.000.000

CONCENTRATION M/10.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	500.000	500.000	376.000	346.000
3 ^h	8.295.000	8.295.000	846.000	710.000
6 ^h	66.360.000	49.770.000	17.800.000	9.030.000
9 ^h	414.750.000	331.800.000	133.300.000	81.300.000
24 ^h	3.871.000.000	3.318.000.000	2.760.000.000	2.060.000.000
48 ^h	2.599.000.000	5.253.500.000	1.150.000.000	1.430.000.000
72 ^h	1.520.750.000	2.101.400.000	316.000.000	1.166.000.000
6 jours	1.493.000.000	525.350.000	66.000.000	80.000.000

CONCENTRATION M/2.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	2,6	10,0	6,41	7,01	2,4	4,4	75	40
6 h	4,4	92,7	6,64	7,96	0,7	3	257	60
9 h	47,0	339,5	7,67	8,53	3,4	1,9	52	94
24 h	78,0	2230,0	7,83	9,34	0,5	2,7	1800	330
48 h	914,0	3918,0	8,96	9,59	3,7	0,8	380	1800
72 h	940,0	1371,0	8,97	9,13	0,03	-1,5	48000	(960)
6 jours	744,0	946	8,87	8,97	-0,3	-0,5	(14400)	(8640)

CONCENTRATION M/2.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,243	0,336	5,38	5,52				
3 h	0,09	0,886	4,98	5,94	-1,3	1,4	(138)	129
6 h	0,01	4,1	4,20	6,61	-2,6	2,2	(69)	81
9 h	0,006	164,6	3,77	8,21	-1,4	5,3	(128)	33
24 h	0,08	2220,0	4,90	9,34	3,7	3,8	243	236
48 h	98,0	2000,0	7,99	9,30	10	-0,1	144	14400
72 h	229,6	343,0	8,35	8,53	1,2	-2,5	1200	(576)
6 jours	186,6	220,0	8,26	8,34	-0,3	-0,6	(14400)	(7200)

CONCENTRATION M/5.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69	2,4	3	75	60
3 ^h	2,6	3,9	6,41	6,59	0,3	3,9	600	46
6 ^h	3,2	60,0	6,51	7,77	1,8	1,9	100	94
9 ^h	11,7	229,8	7,06	8,35	2,8	3,4	321	265
24 ^h	79,6	2389,9	7,90	9,37	4,3	0,1	327	(14400)
48 ^h	1750,0	2660,0	9,24	9,42	0,5	-0,6	2880	(2400)
72 ^h	2612,0	1736,0	9,41	9,23	-1,1	-3	(3927)	(1440)
6 jours	1175,0	220,0	9,06	8,34				

CONCENTRATION M/5.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	0,203	0,276	5,30	5,44	-0,5	0,4	(360)	450
3 ^h	0,136	0,383	5,13	5,58	0,2	2,8	900	64
6 ^h	0,156	2,6	5,19	6,42	0,8	1,1	225	163
9 ^h	0,270	5,6	5,43	6,75	1,8	8,5	500	10
24 ^h	0,963	2030,0	5,98	9,30	6,7	0,4	214	3800
48 ^h	119,6	1789,2	8,07	9,25	2,8	-1,7	514	(846)
72 ^h	833,0	820,0	8,92	8,91	-0,6	-1,9	(7200)	(2277)
6 jours	533,0	213,0	8,72	8,32				

CONCENTRATION M/10.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	5,5	8,2	6,74	6,91	3,5	4	51	45
6 h	11,0	49,7	7,04	7,69	1	2,6	180	69
9 h	52,5	331,8	7,72	8,51	2,2	2,7	81	66
24 h	2046,0	3318,0	9,30	9,51	5,2	3,3	173	272
48 h	1354,0	5253,5	9,13	9,72	-0,5	0,7	(2880)	2057
72 h	276,5	2101,4	8,44	9,32	-2,3	-1,4	(626)	(1028)
6 jours	207,3	525,3	8,31	8,72	-0,4	-1,3	(10800)	(3323)

CONCENTRATION M/10.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,223	0,346	5,34	5,53				
3 h	0,383	0,710	5,58	5,85	0,8	1	225	180
6 h	3,4	9,0	6,53	6,95	3,1	3,6	58	50
9 h	29,3	81,3	7,46	7,91	3,1	3,2	58	56
24 h	84,6	2060,0	7,92	9,31	1,5	4,6	600	191
48 h	730,0	1430,0	8,86	9,15	3,1	-0,5	464	(2880)
72 h	200,0	1166,0	8,30	9,06	-1,8	-0,3	(800)	(4800)
6 jours	72,0	80,0	7,85	7,90	-1,5	-3,8	(288)	(1136)

CONCENTRATION M/50.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	0,500	0,500	5,69	5,69	5,6	4,4	32	40
3 ^h	24,8	10,0	7,39	7,01	0,1	3	1800	60
6 ^h	27,4	92,7	7,43	7,96	3,4	1,9	52	94
9 ^h	378,7	339,5	8,57	8,53	3,2	2,7	280	330
24 ^h	3619,4	2230,0	9,55	9,34	0,5	0,8	2880	1800
48 ^h	5093,4	3918,0	9,70	9,59	-1,3	-1,5	(1107)	(960)
72 ^h	2015,5	1371,0	9,30	9,13	-0,8	-0,5	(5400)	(8640)
6 jours	1175,4	946	9,06	8,97				

CONCENTRATION M/50.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 ^h	0,266	0,336	5,42	5,52				
3 ^h	0,263	0,886	5,41	5,94	-0,03	1,4	(6000)	129
6 ^h	7,1	4,1	6,85	6,61	4,8	2,2	37	81
9 ^h	53,6	164,6	7,72	8,21	3,2	5,3	56	33
24 ^h	3060,0	2220,0	9,48	9,34	5,8	3,8	155	236
48 ^h	1660,0	2000,0	9,22	9,30	-0,8	-0,1	(1800)	14400
72 ^h	386,0	343,0	8,58	8,53	-2,1	-2,5	(685)	(576)
6 jours	206,0	220,0	8,31	8,34	-0,9	-0,6	(4800)	(7200)

CONCENTRATION M/100.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	13,5	11,0	7,13	7,04	4,8	4	37	45
6 h	160,3	106,4	8,20	8,02	3,5	3	51	60
9 h	345,6	246,0	8,53	8,39	1	1	180	180
24 h	5612,9	3318,0	9,74	9,51	4	3	225	300
48 h	3981,0	3318,0	9,59	9,51	-0,5	0	(2880)	
72 h	1659,0	2765,0	9,21	9,44	-1,2	-0,2	(1200)	(7200)
6 jours	1232,0	1539,0	9,08	9,18	-0,4	-0,8	(10800)	(5400)

CONCENTRATION M/100.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,296	0,410	5,47	5,61				
3 h	0,603	1,04	5,78	6,01	1	1,3	180	146
6 h	13,7	30,2	7,13	7,48	4,5	4,9	40	36
9 h	68,0	101,0	7,83	8,00	2,3	1,7	78	105
24 h	2930,0	2500,0	9,46	9,39	5,4	4,6	166	195
48 h	1000,0	851,7	9	8,92	-1,5	-1,5	(960)	(960)
72 h	696,0	333,0	8,84	8,52	-0,5	-1,3	(2880)	(1107)
6 jours	373,0	193,0	8,57	8,28	-0,9	-0,8	(4800)	(5400)

CONCENTRATION M/1.000.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	35,9	11,0	7,55	7,04	6	4	30	45
6 h	282,0	106,4	8,45	8,02	3	3	60	60
9 h	337,3	246,0	8,52	8,39	2	1	90	180
24 h	6912,5	3318,0	9,83	9,51	4	3	225	300
48 h	2903,2	3318,0	9,46	9,51	-1	0	(1440)	
72 h	1935,5	2765,0	9,28	9,44	-0,6	-0,2	(2400)	(7200)
6 jours	1390,0	1539,0	9,14	9,18	-0,4	-0,8	(10800)	(5400)

CONCENTRATION M/1.000.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,386	0,410	5,58	5,61				
3 h	1,5	1,04	6,18	6,01	2	1,3	90	146
6 h	39,6	30,2	7,59	7,48	4,7	4,9	38	36
9 h	159,0	101,0	8,20	8	2	1,7	90	105
24 h	3460,0	2500,0	9,53	9,39	4,4	4,6	204	195
48 h	1530,0	851,7	9,18	8,92	-1,1	-1,5	(1300)	(960)
72 h	550,0	333,0	8,74	8,52	-1,4	-1,3	(1028)	(1107)
6 jours	206,0	193,0	8,31	8,28	-1,4	-0,8	(3080)	(5400)

CONCENTRATION M/10.000.000

MICROBES VISIBLES

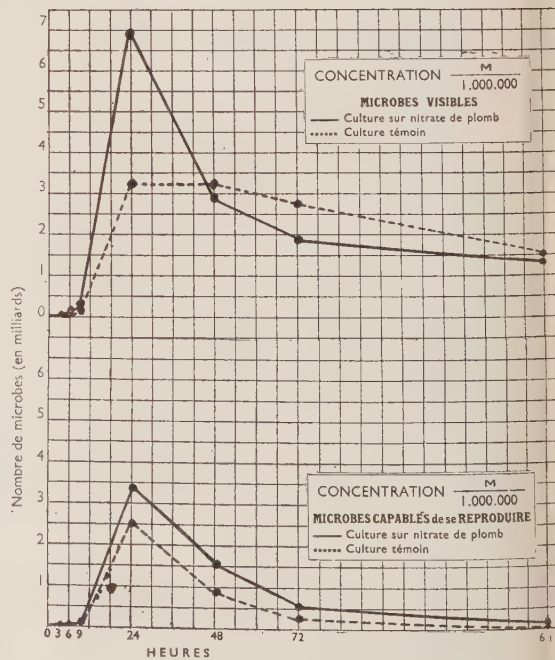
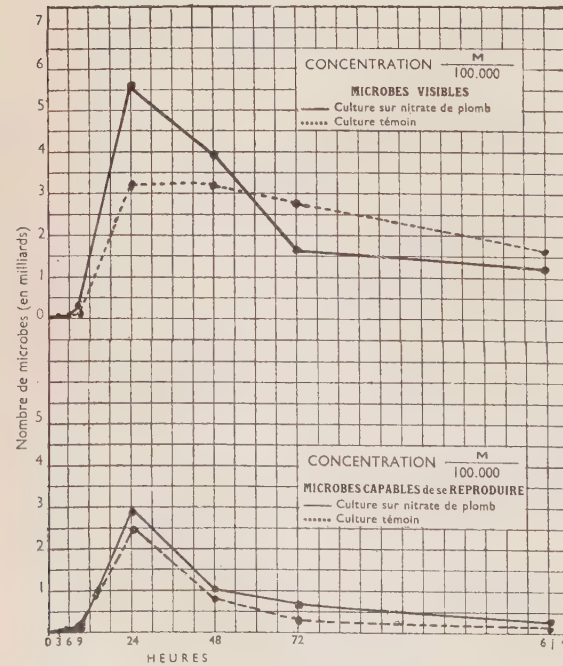
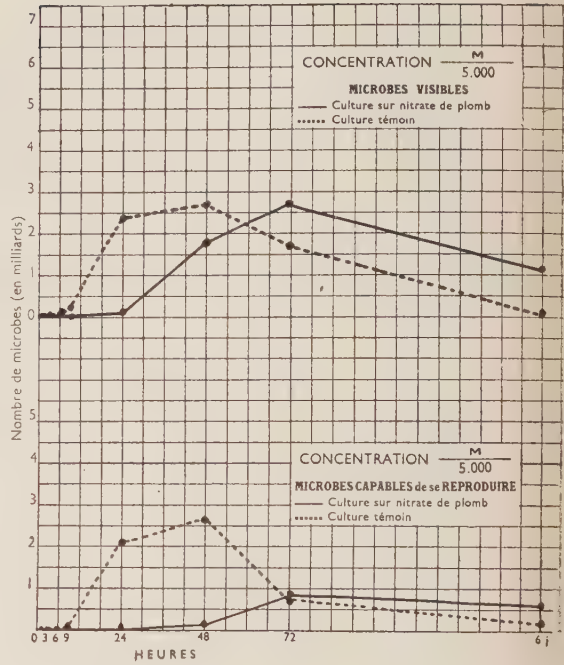
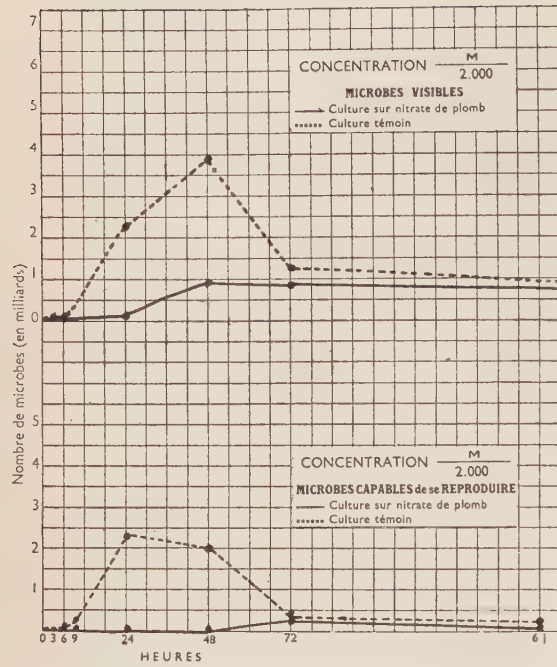
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	8,2	8,2	6,91	6,91	4,0	4,0	45	45
6 h	66,3	49,7	7,82	7,69	-3,0	2,6	60	69
9 h	414,7	331,8	8,60	8,51	2,6	2,7	69	66
24 h	3871,0	3318,0	9,58	9,51	3,2	3,3	281	272
48 h	2599,0	5253,5	9,41	9,72	-0,5	0,7	(2880)	2057
72 h	1520,7	2101,4	9,18	9,32	-0,7	-1,4	(2057)	(1028)
6 jours	1493,1	525,3	9,17	8,72	-0,03	-1,3	(144000)	(3323)

CONCENTRATION M/10.000.000

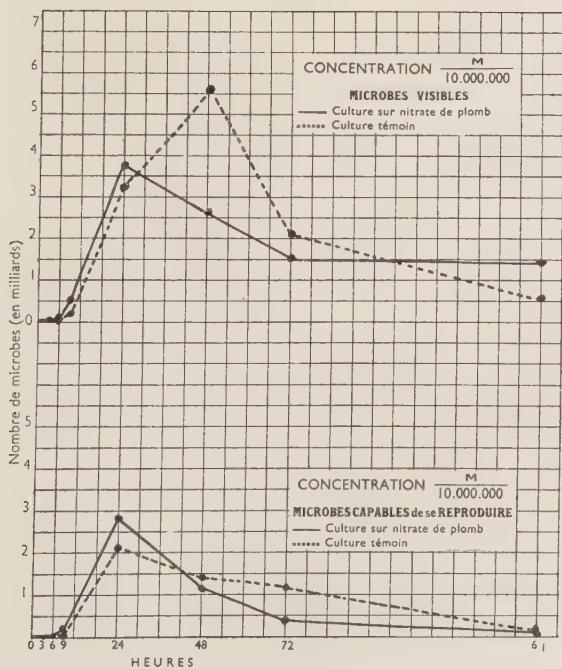
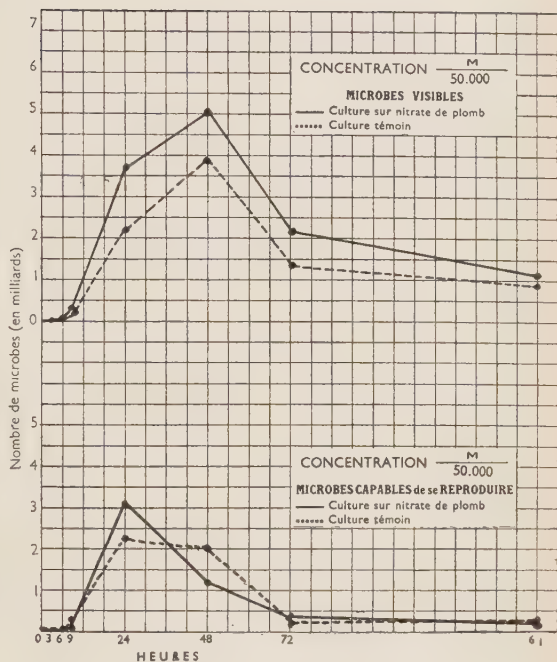
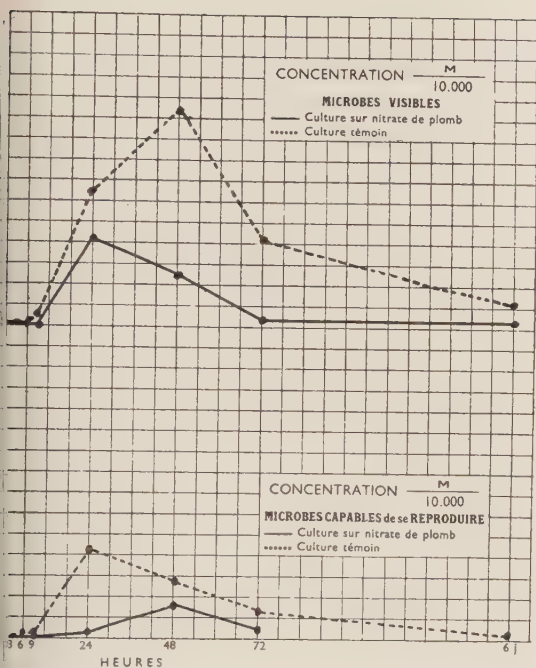
MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin	Culture sur nitrate de plomb	Culture témoin
0 h	0,376	0,346	5,57	5,53				
3 h	0,846	0,710	5,92	5,85	1,1	1	163	180
6 h	17,6	9,0	7,25	6,95	1,4	3,6	128	50
9 h	133,3	81,3	8,12	7,91	2,9	3,2	62	56
24 h	2760,0	2060,0	9,44	9,31	4,4	4,6	204	191
48 h	1150,0	1430,0	9,06	9,15	-1,2	-0,5	(1200)	(2880)
72 h	316,0	1166,0	8,49	9,06	-1,9	-0,3	(758)	(4800)
6 jours	66,0	80,0	7,81	7,90	-2,9	-3,8	(1489)	(1136)

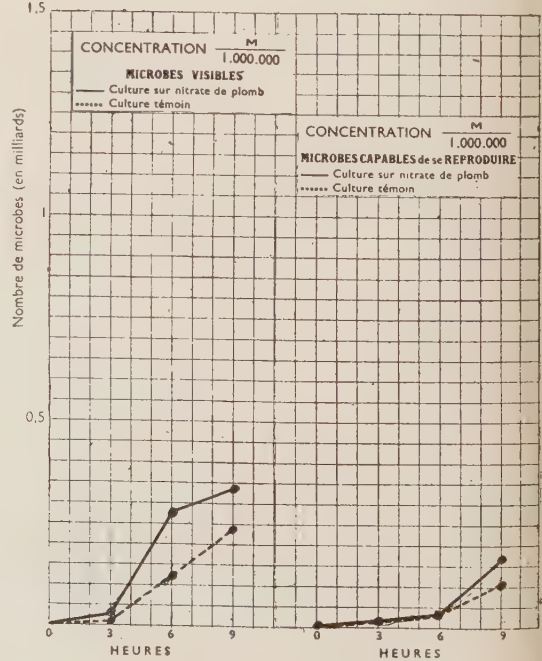
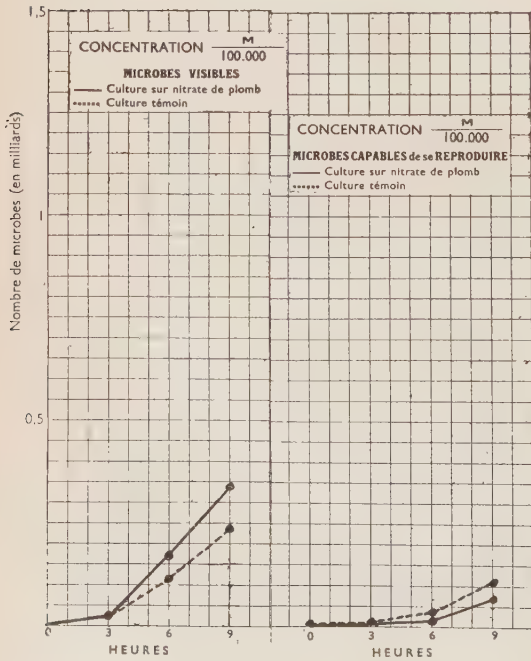
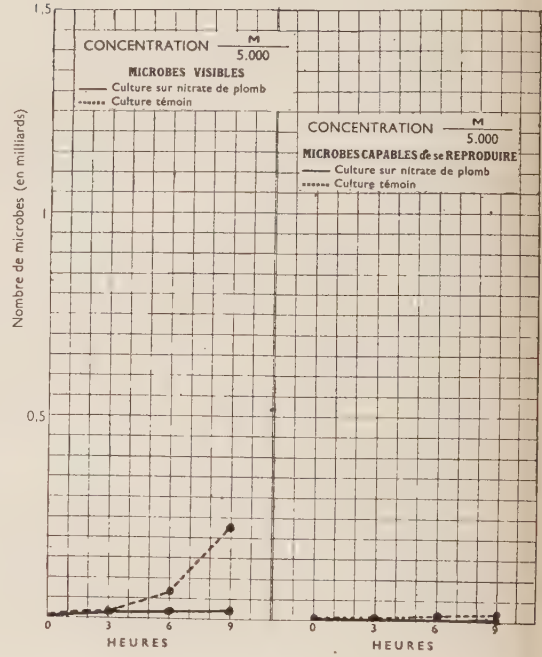
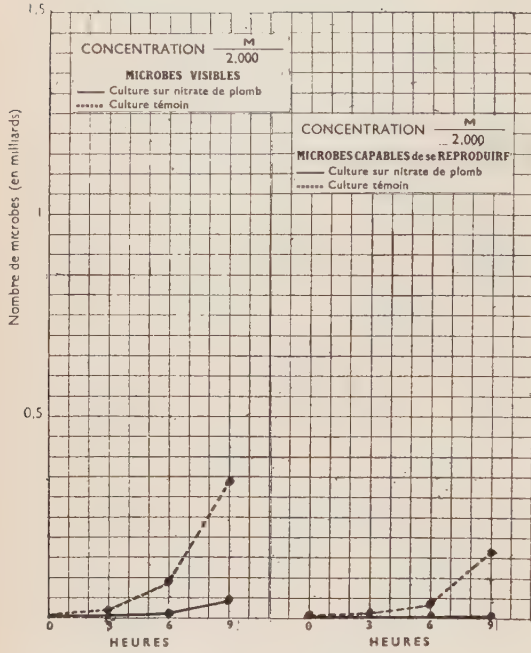
Courbes des nombres de Microbes



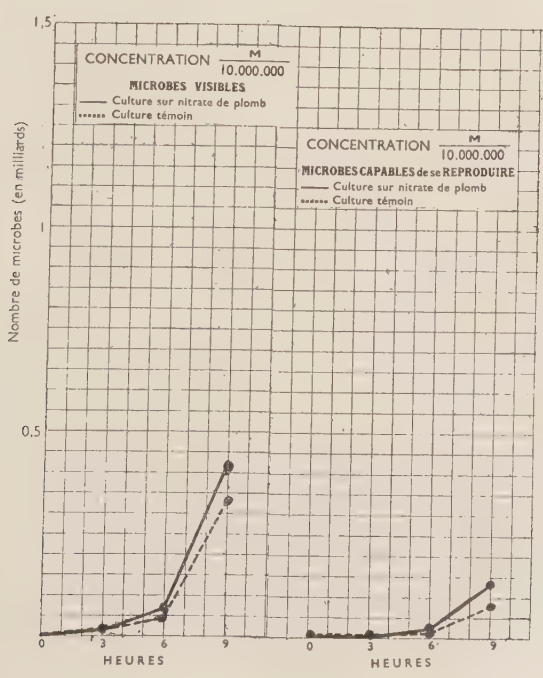
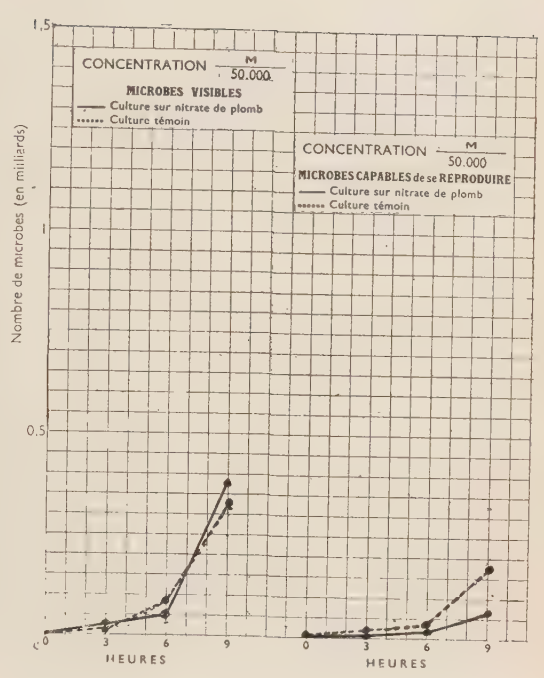
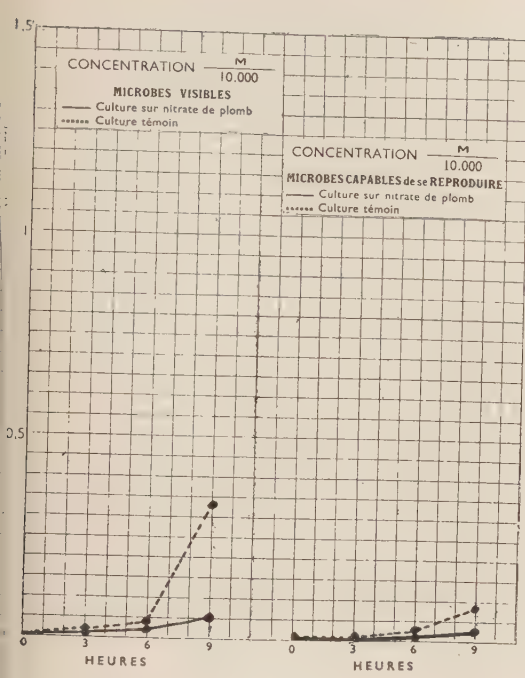
en fonction du temps



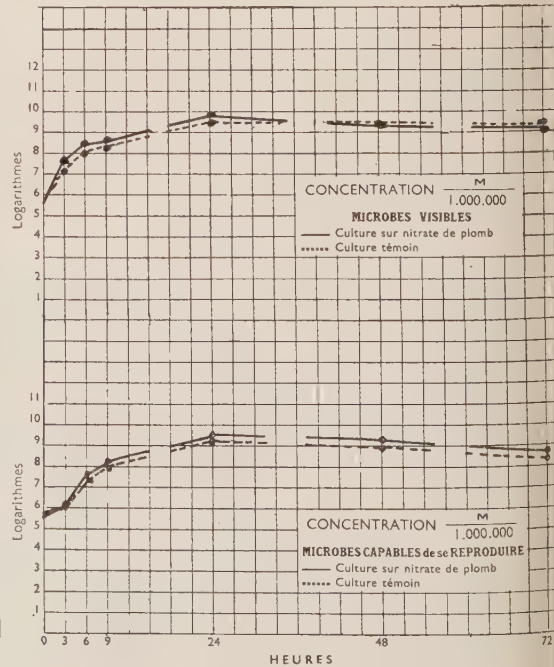
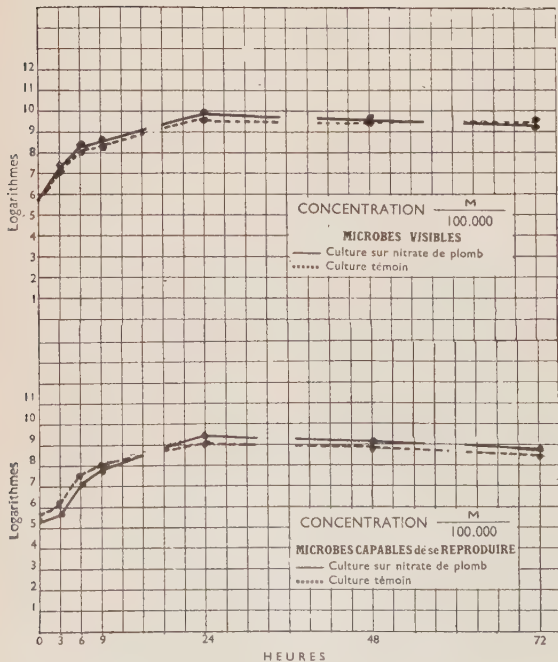
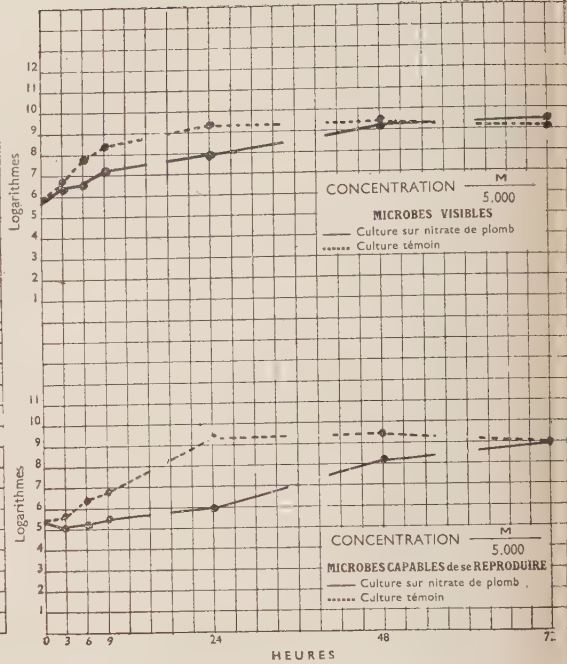
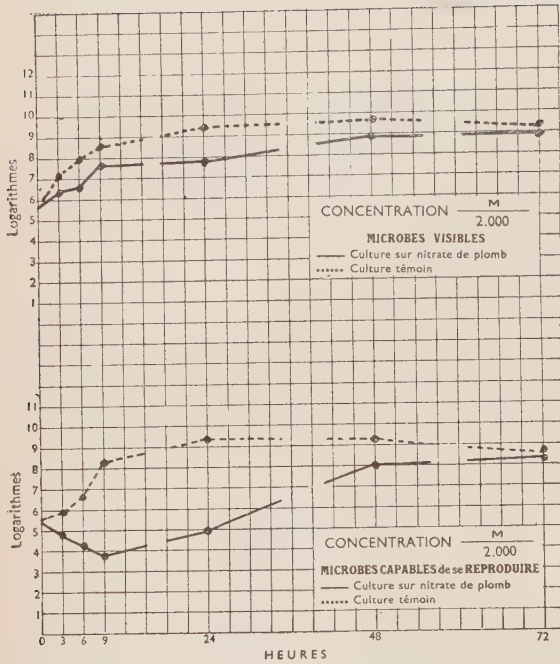
Courbes des nombres de Microbes (Premières heures)



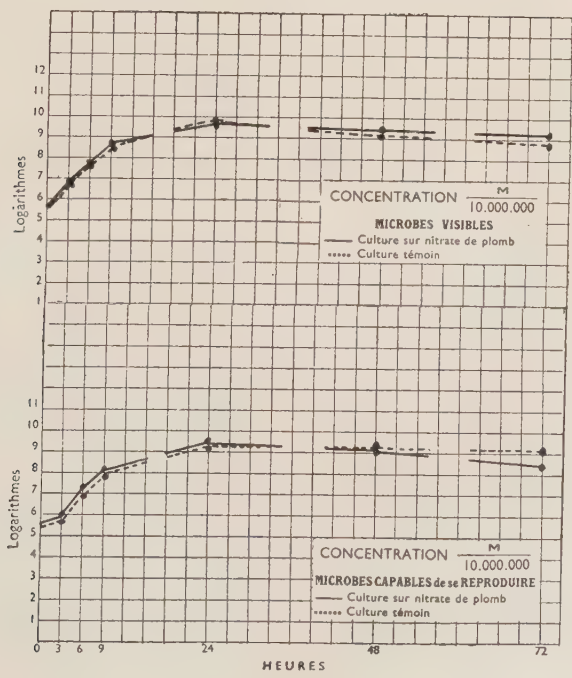
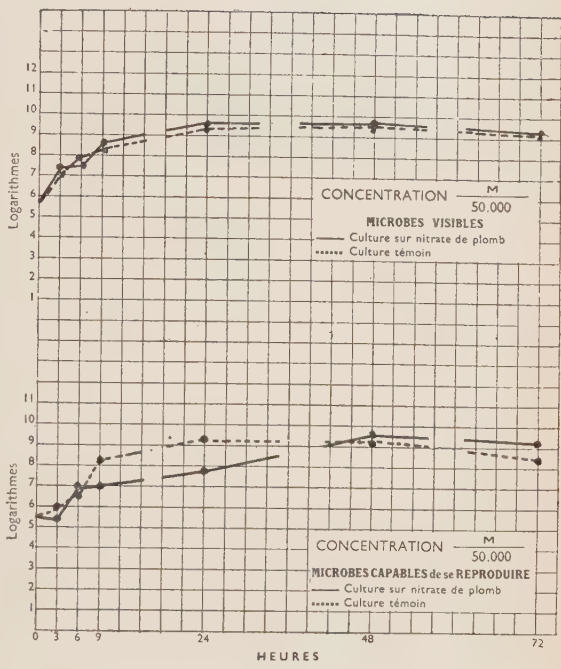
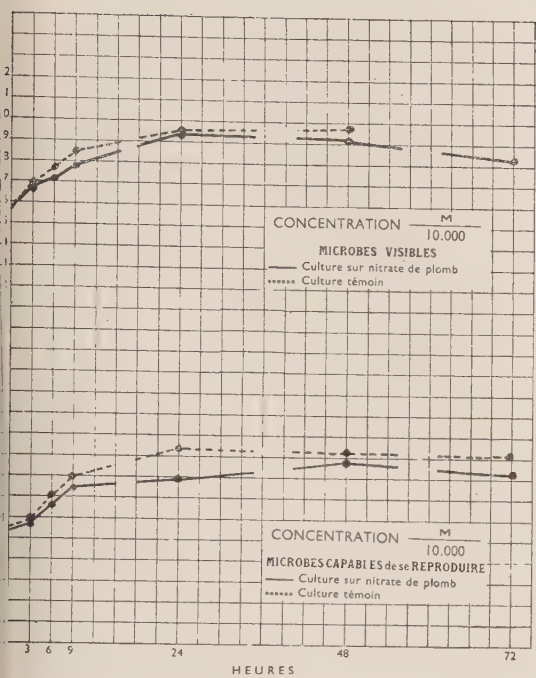
en fonction du temps.
de la multiplication)



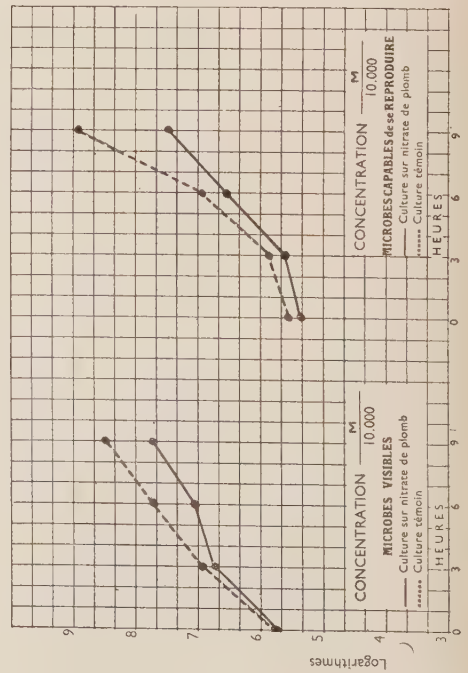
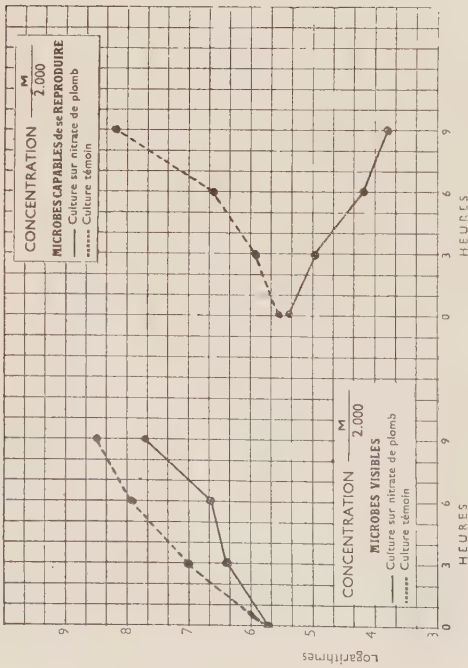
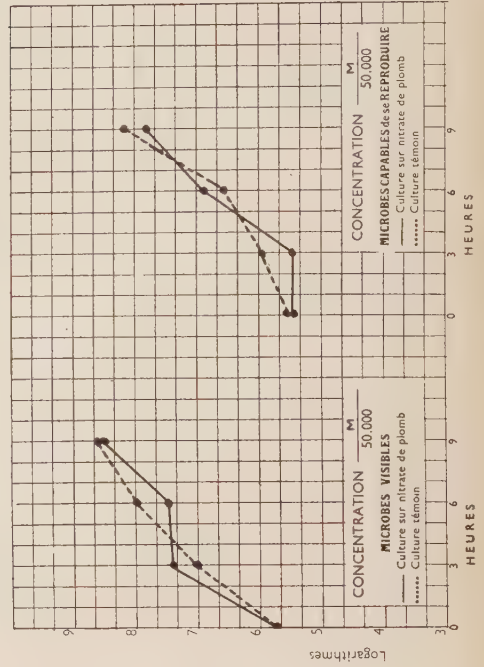
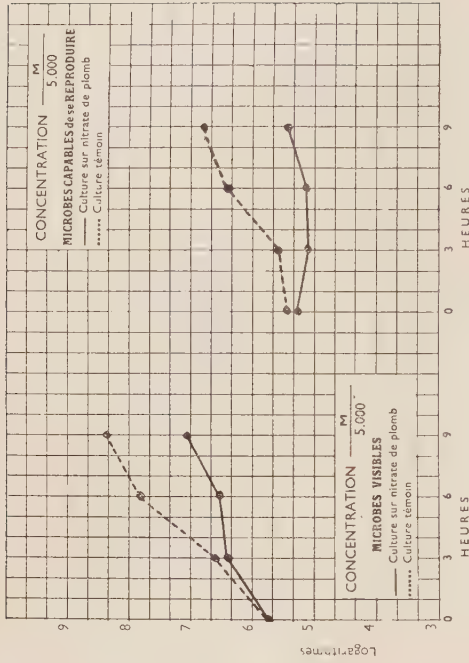
Courbes des logarithmes des nombres



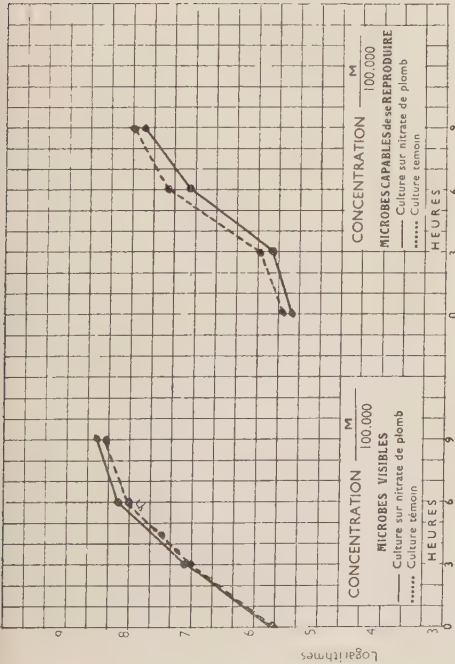
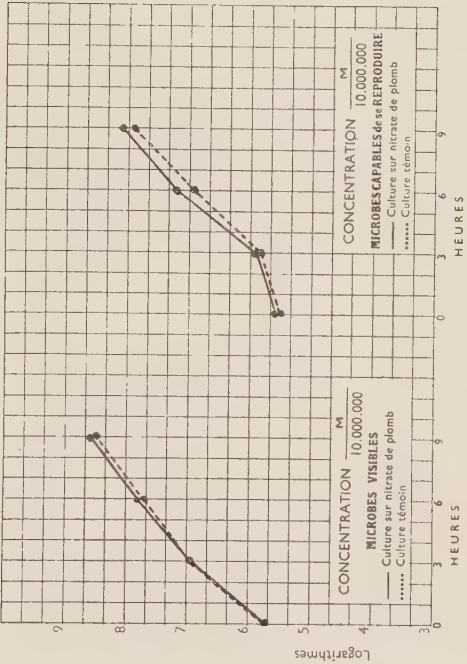
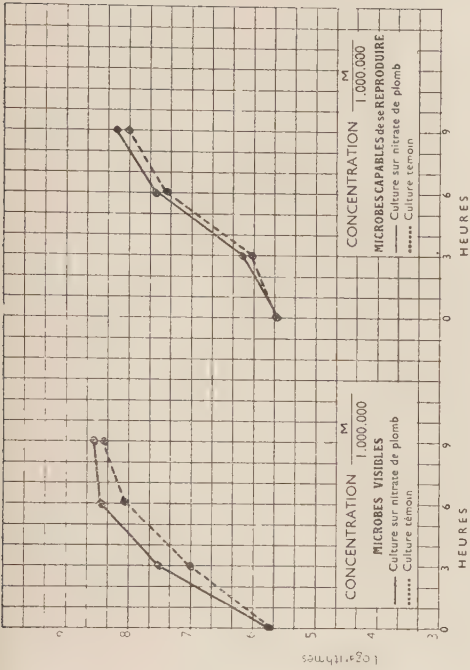
de Microbes en fonction du temps



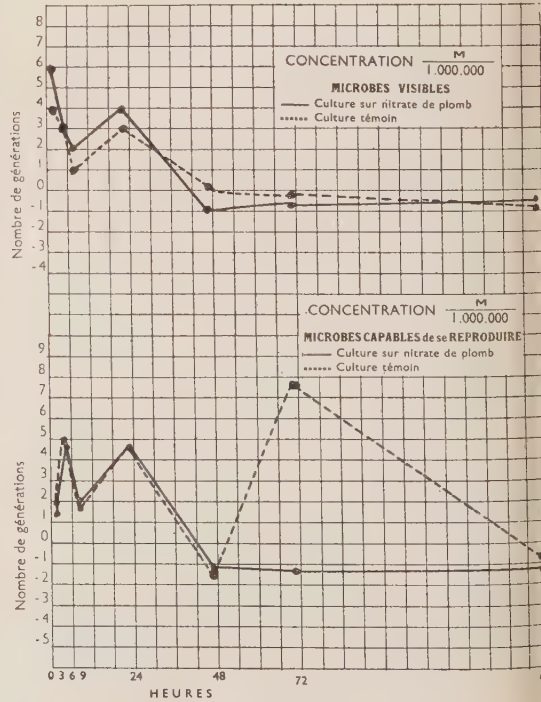
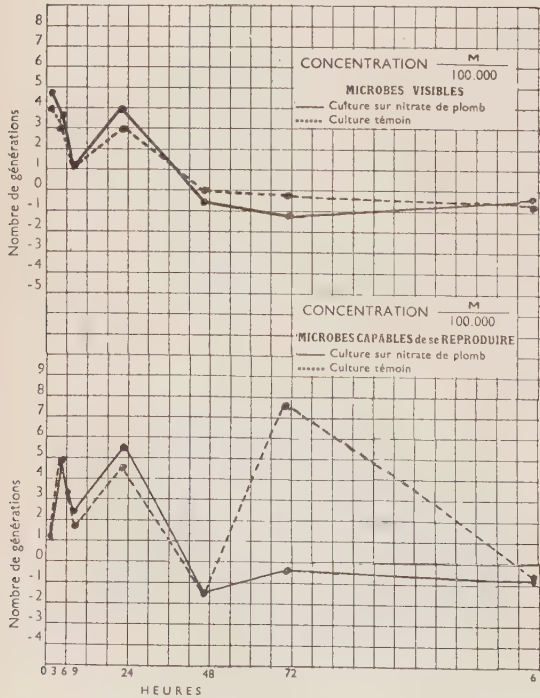
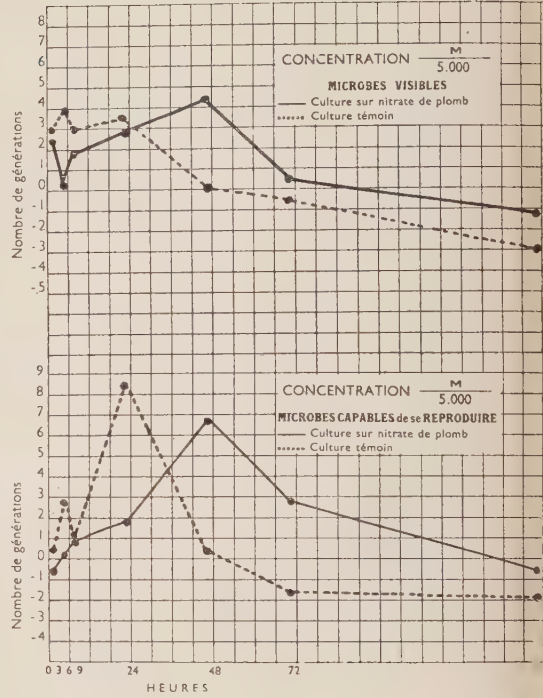
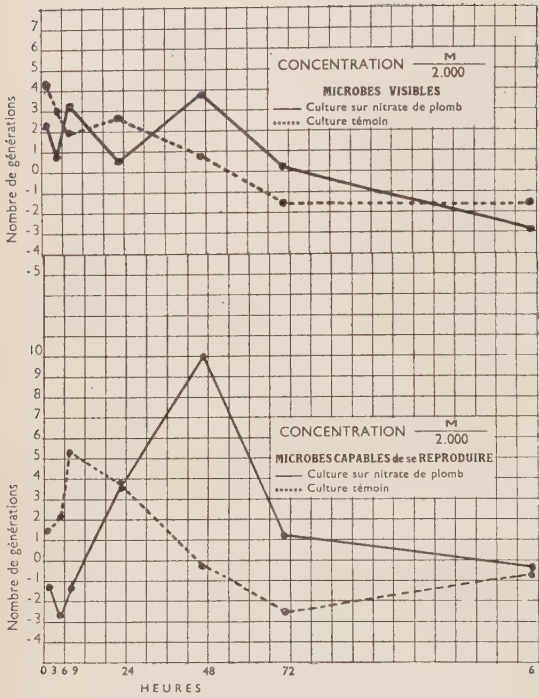
Courbes des logarithmes des nombres (Premières heures)



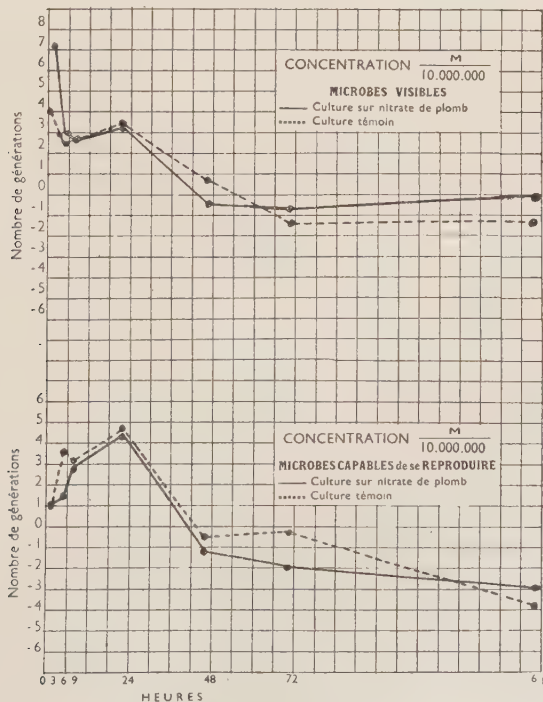
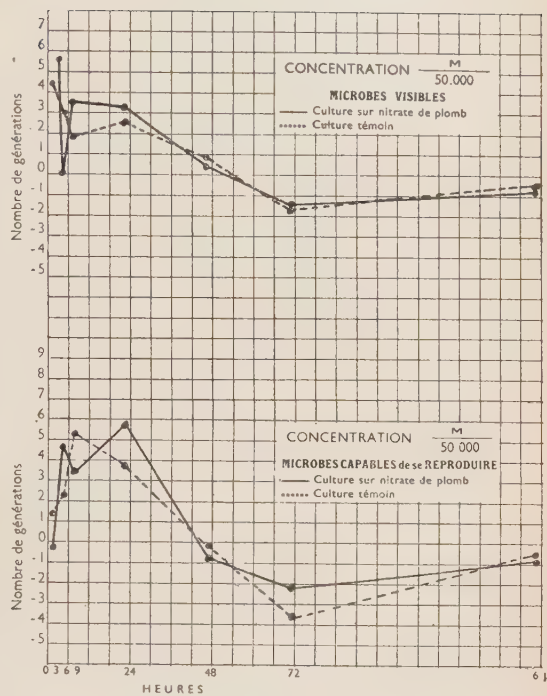
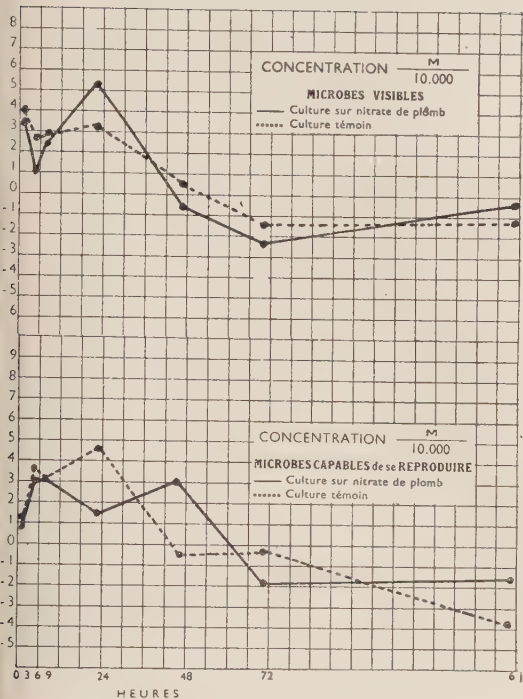
de Microbes en fonction du temps
de la multiplication)



Courbes des nombres de Générations

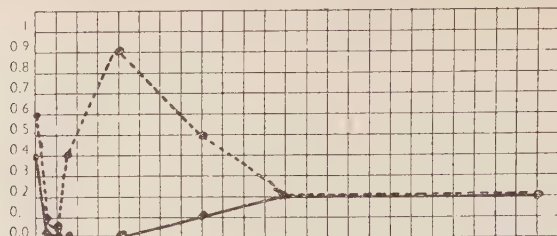


en fonction du temps

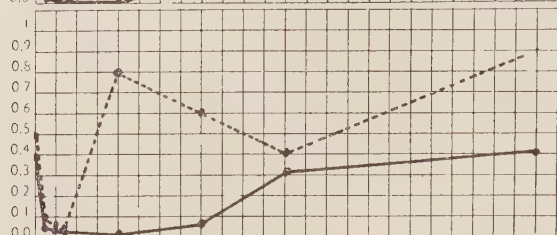


Courbes des Rapports de Vitalité en fonction du temps

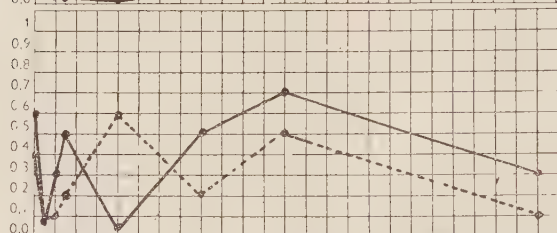
Nombre de Microbes capables de se reproduire
 Nombre de Microbes visibles
 RAPPORT DE VITALITÉ =



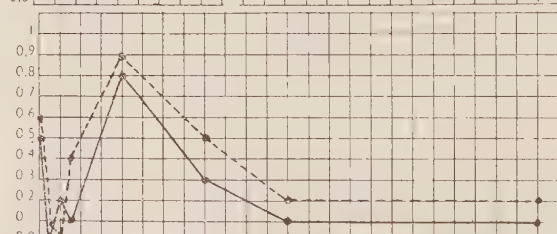
Concentration M/2.000



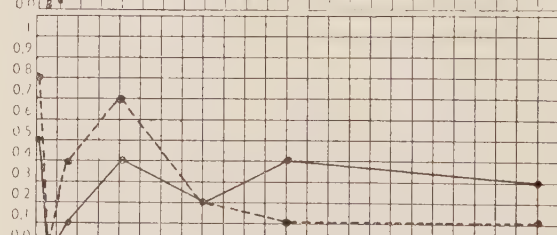
Concentration M/5.000



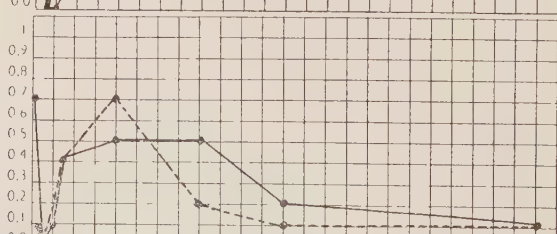
Concentration M/10.000



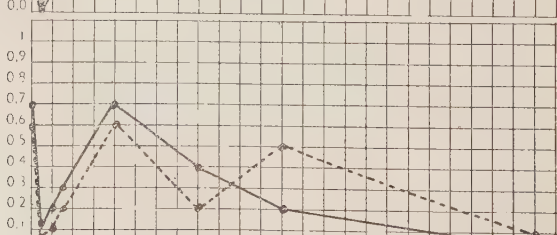
Concentration M/50.000



Concentration M/100.000



Concentration M/1.000.000



Concentration M/10.000.000

HEURES

IV

ACTION DU NITRATE
MERCURIQUE

CONCENTRATION M/5.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	276.000	156.000
3 h	735.000	6.825.000	323.000	300.000
6 h	1.365.000	25.200.000	249.600	10.600.000
9 h	3.570.000	210.000.000	288.300	130.000.000
24 h	3.360.000	3.990.000.000	98.600	1.930.000.000
48 h	3.570.000	4.450.000.000	96.000	1.160.000.000
72 h	5.670.000	924.000.000	373.000	420.000.000
6 jours	3.400.000	152.500.000	160.000	136.000.000

CONCENTRATION M/10.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	220.000	156.000
3 h	577.500	6.825.000	123.000	300.000
6 h	1.365.000	25.200.000	53.000	10.600.000
9 h	3.150.000	210.000.000	30.000	130.000.000
24 h	3.570.000	3.990.000.000	23.000	1.930.000.000
48 h	16.800.000	4.450.000.000	403.600	1.160.000.000
72 h	1.050.000.000	924.000.000	440.000.000	420.000.000
6 jours	680.000.000	152.500.000	94.000.000	136.000.000

CONCENTRATION M/50.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	360.000	262.000
3 h	4.300.000	1.400.000	326.000	280.000
6 h	10.750.000	3.025.000	153.000	11.000.000
9 h	23.650.000	31.350.000	73.000	132.000.000
24 h	180.000.000	1.080.000.000	460.000	2.360.000.000
48 h	4.902.000.000	3.550.000.000	830.000.000	1.600.000.000
72 h	3.440.000.000	2.166.000.000	364.000.000	183.000.000
6 jours	480.700.000	206.600.000	84.300.000	90.000.000

CONCENTRATION M/100.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	216.000	283.000
3 h	1.803.000	6.462.500	61.500	660.000
6 h	3.315.000	61.420.000	29.700	4.300.000
9 h	11.700.000	162.400.000	12.060	156.000.000
24 h	390.000.000	2.975.000.000	3.060	2.830.000.000
48 h	5.460.000.000	3.510.000.000	1.870.000.000	1.030.000.000
72 h	2.398.000.000	2.535.000.000	526.000.000	389.000.000
6 jours	90.300.000	1.182.500.000	86.000.000	193.000.000

CONCENTRATION M/1.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	276.000	350.000
3 h	1.881.250	6.075.000	193.000	560.000
6 h	7.202.500	72.900.000	333.000	20.000.000
9 h	10.750.000	203.225.000	830.000	260.000.000
24 h	258.000.000	3.206.400.000	150.000.000	2.860.000.000
48 h	3.225.000.000	4.124.700.000	600.000.000	1.360.000.000
72 h	2.193.000.000	2.150.000.000	806.000.000	230.000.000
6 jours	236.500.000	1.106.000.000	170.000.000	106.000.000

CONCENTRATION M/10.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	300.000	262.000
3 h	3.762.500	1.400.000	230.000	280.000
6 h	6.987.500	3.025.000	360.000	11.000.000
9 h	10.750.000	31.350.000	943.000	132.000.000
24 h	230.000.000	1.080.000.000	194.000.000	2.360.000.000
48 h	6.170.500.000	3.550.000.000	1.966.000.000	1.600.000.000
72 h	5.160.000.000	2.166.000.000	377.000.000	183.000.000
6 jours	501.600.000	206.600.000	140.300.000	90.000.000

CONCENTRATION M/100.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	163.000	283.000
3 h	1.852.000	6.462.500	56.600	660.000
6 h	4.192.000	61.420.000	228.300	4.300.000
9 h	14.095.000	162.400.000	1.063.000	156.000.000
24 h	354.600.000	2.975.000.000	258.000.000	2.830.000.000
48 h	4.627.000.000	3.510.000.000	2.000.000.000	1.030.000.000
72 h	2.925.000.000	2.535.000.000	190.000.000	389.000.000
6 jours	192.450.000	1.182.500.000	156.600.000	193.000.000

CONCENTRATION M/5.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	0,735	6,8	5,86	6,83	0,5	3,4	360	52
6 h	1,3	25,2	6,13	7,40	0,9	1,9	200	90
9 h	3,5	210,0	6,55	8,32	1,4	3,0	123	60
24 h	3,3	3990,0	6,52	9,60	-0,1	4,2	(900)	214
48 h	3,5	4450,0	6,55	9,64	1,4	0,1	1028	14400
72 h	5,6	924,0	6,75	8,96	0,6	-2,2	2400	(654)
6 jours	3,4	152,5	6,53	8,18	-0,7	-2,5	(6171)	(1728)

CONCENTRATION M/5.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,276	0,156	5,44	5,19				
3 h	0,323	0,300	5,50	5,47	0,2	0,9	900	200
6 h	0,249	10,6	5,39	7,02	0,3	5,1	600	35
9 h	0,288	130,0	5,45	8,11	0,2	3,6	900	50
24 h	0,098	1930,0	4,99	9,28	-1,5	3,5	(600)	257
48 h	0,096	1160,0	4,98	9,06	-0,03	-0,7	(48000)	(2057)
72 h	0,373	420,0	5,57	8,62	2	-1,4	7200	(1028)
6 jours	0,160	136,0	5,20	8,13	-1,2	-1,6	(3600)	(270)

CONCENTRATION M/10.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	0,577	6,8	5,83	6,83	0,4	3,4	450	52
6 h	1,3	25,2	6,13	7,40	1	1,9	180	90
9 h	3,1	210,0	6,49	8,32	1,2	3,0	150	60
24 h	3,5	3990,0	6,55	9,60	0,2	4,2	4500	214
48 h	16,8	4450,0	7,22	9,64	2,2	0,1	654	14400
72 h	1050,0	924,0	9,02	8,96	2,7	-2,2	533	(654)
6 jours	680,0	152,5	8,83	8,18	-0,6	-2,5	(7200)	(1728)

CONCENTRATION M/10.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,220	0,156	5,34	5,19				
3 h	0,123	0,300	5,08	5,47	-0,8	0,9	(225)	200
6 h	0,053	10,6	4,72	7,02	-1	5,1	(180)	35
9 h	0,030	130,0	4,47	8,11	-0,8	3,6	(225)	50
24 h	0,023	1930,0	4,36	9,28	-0,3	3,5	(3000)	257
48 h	0,403	1160,0	5,60	9,06	4	-0,7	360	(2057)
72 h	440,0	420,0	8,64	8,62	10	-1,4	144	(1028)
6 jours	94,0	136,0	7,97	8,13	-2,2	-1,6	(1900)	(270)

CONCENTRATION M/50.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	4,3	1,4	6,63	6,14	3	1,5	60	120
6 h	10,7	3,0	7,02	6,48	1,3	1	147	180
9 h	23,6	231,3	7,37	8,36	1	6,2	180	29
24 h	180,0	1080,0	8,25	9,03	2,9	2,2	310	454
48 h	4902,0	3550,0	9,69	9,55	4,8	1,7	300	847
72 h	3440,0	2166,0	9,53	9,33	-0,5	-0,7	(2800)	(2071)
6 jours	480,7	206,6	8,68	8,31	-2,8	-3	(1542)	(1440)

CONCENTRATION M/50.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,360	0,262	5,55	5,41				
3 h	0,326	0,280	5,51	5,44	-0,1	0,1	(1800)	1800
6 h	0,153	11,0	5,18	7,04	-1	5,3	(180)	33
9 h	0,073	132,0	4,86	8,12	-1	3,6	(180)	50
24 h	0,460	2360,0	5,66	9,37	2,6	4,1	346	243
48 h	830,0	1600,0	8,91	9,20	10	-0,5	144	(2880)
72 h	364,0	183,0	8,56	8,26	-1	-3,1	(1440)	(464)
6 jours	84,3	90,0	7,92	7,95	-2	-1,0	(2160)	(4320)

CONCENTRATION M/100.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	1,8	6,4	6,25	6,81	1,8	3,4	100	52
6 h	3,3	61,4	6,51	7,78	0,8	3,2	225	56
9 h	11,7	162,4	7,06	8,20	1,5	1,4	120	128
24 h	390,0	2975,0	8,59	9,47	5,0	5,0	180	214
48 h	5460,0	3510,0	9,73	9,54	3,4	3,4	423	7200
72 h	2398,5	2535,0	9,37	9,40	-1,2	-0,4	(1200)	(3600)
6 jours	90,3	1182,5	7,95	9,07	-4,7	-1,1	(919)	(3927)

CONCENTRATION M/100.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,216	0,283	5,33	5,45				
3 h	0,061	0,660	4,78	5,81	1,8	1,2	(100)	150
6 h	0,029	4,3	4,47	6,63	-1	2,7	(180)	66
9 h	0,012	156,0	4,07	8,19	-1,3	5,2	(146)	34
24 h	0,003	2830,0	3,48	9,45	-2	4,2	(450)	214
48 h	1870,0	1030,0	9,27	9,01	19	-1,4	75	(1028)
72 h	526,0	389,0	8,72	8,58	-1,5	-1,4	(960)	(1028)
6 jours	86,0	193,0	7,93	8,28	-2,6	-1,0	(1660)	(4320)

CONCENTRATION M/1.000.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	1,8	6,0	6,27	6,78	1,9	0,3	90	600
6 h	7,2	72,9	6,85	7,86	1,9	3,5	90	51
9 h	10,7	203,2	7,02	8,30	0,5	1,4	360	128
24 h	258,0	3206,4	8,41	9,50	4,6	4,0	195	225
48 h	3225,0	4124,7	9,50	9,64	3,6	0,4	400	3800
72 h	2193,0	2150,0	9,34	9,33	-0,5	-1,0	(2880)	(1440)
6 jours	236,5	1106,0	8,37	9,04	-3,2	-0,9	(1353)	(4800)

CONCENTRATION M/1.000.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,276	0,350	5,44	5,54	-0,5	0,6	(360)	300
3 h	0,193	0,560	5,28	5,74	0,8	5,2	225	34
6 h	0,333	20,0	5,52	7,30	1,3	3,7	138	48
9 h	0,830	260,0	5,91	8,41	7,5	3,4	120	264
24 h	150,0	2860,0	8,17	9,45	2,0	-1,0	720	(1440)
48 h	600,0	1360,0	8,77	9,13	0,4	-2,7	3600	(533)
72 h	806,0	230,0	8,90	8,30	-2,2	-0,9	(1900)	(4800)
6 jours	170,0	106,0	8,23	8,02				

CONCENTRATION M/10.000.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69	2,5	1,5	72	120
3 h	3,7	1,4	6,44	6,14	1,3	1	146	180
6 h	6,9	3,0	6,84	6,48	0,6	6,2	300	29
9 h	10,7	231,3	7,02	8,36	4,4	2,2	204	454
24 h	230,0	1080,0	8,36	9,03	4,7	1,7	348	847
48 h	6170,5	3550,0	9,79	9,55	-0,2	-0,7	(7200)	(2071)
72 h	5160,0	2166,0	9,71	9,33	-3	-3	(1440)	(1440)
6 jours	501,6	206,6	8,69	8,31				

CONCENTRATION M/10.000.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,300	0,262	5,47	5,41	1,6	0,1	113	1800
3 h	0,230	0,280	5,96	5,44	-1,3	5,3	(146)	33
6 h	0,360	11,0	5,55	7,04	-3	3,6	(60)	50
9 h	0,943	132,0	4,63	8,12	12	4,1	75	243
24 h	194,0	2360,0	8,28	9,37	3,3	-0,5	436	(2880)
48 h	1966,0	1600,0	9,29	9,20	-2,4	-3,1	(600)	(464)
72 h	377,0	183,0	8,57	8,26	-1,4	-1,0	(3080)	(4320)
6 jours	140,3	90,0	8,14	7,95				

CONCENTRATION M/100.000.000

MICROBES VISIBLES

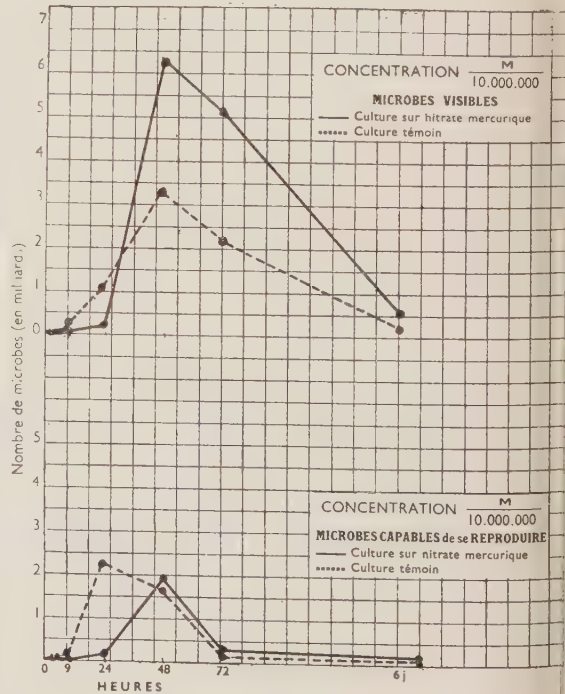
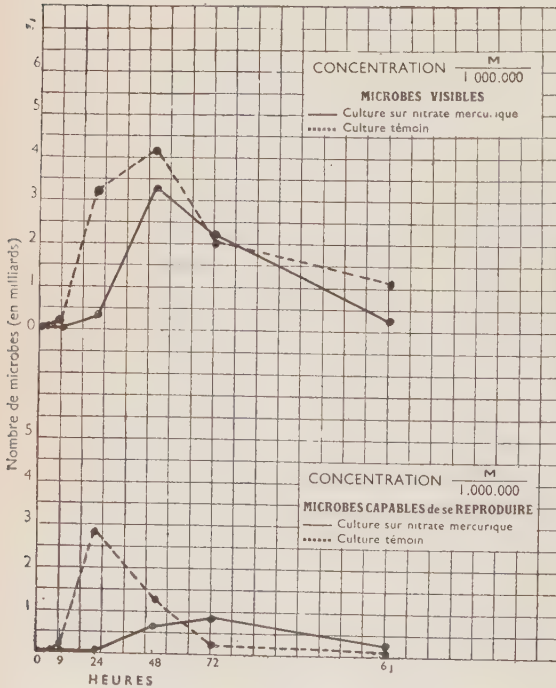
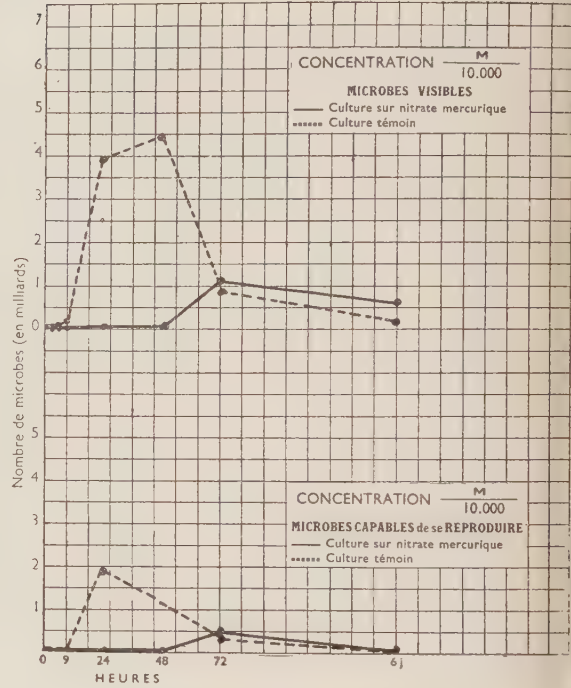
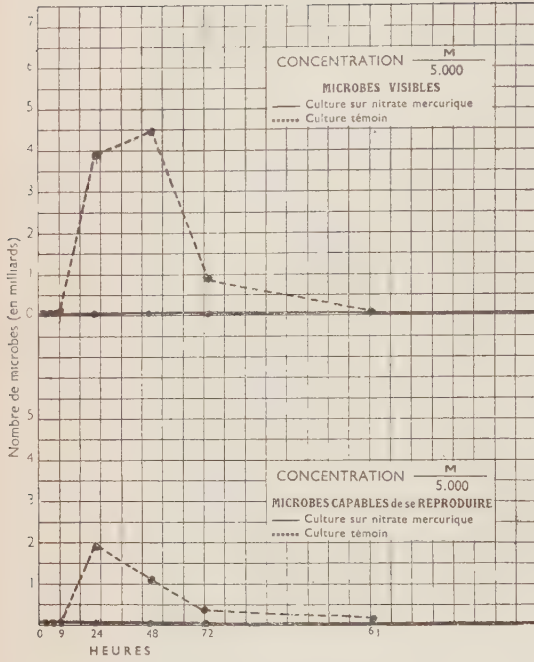
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	1,8	6,4	6,26	6,81	1,9	3,4	90	52
6 h	4,1	61,4	6,62	7,78	1,2	3,2	150	56
9 h	14,0	162,4	7,14	8,20	1,7	1,4	105	128
24 h	354,6	2975,0	8,54	9,47	4,0	4,2	225	214
48 h	4627,0	3510,0	9,66	9,54	0,2	0,2	389	7200
72 h	2925,0	2535,0	9,46	9,40	-0,6	-0,4	(2400)	(3600)
6 jours	192,4	1182,5	8,28	9,07	-3,9	-1,1	(1107)	(3927)

CONCENTRATION M/100.000.000

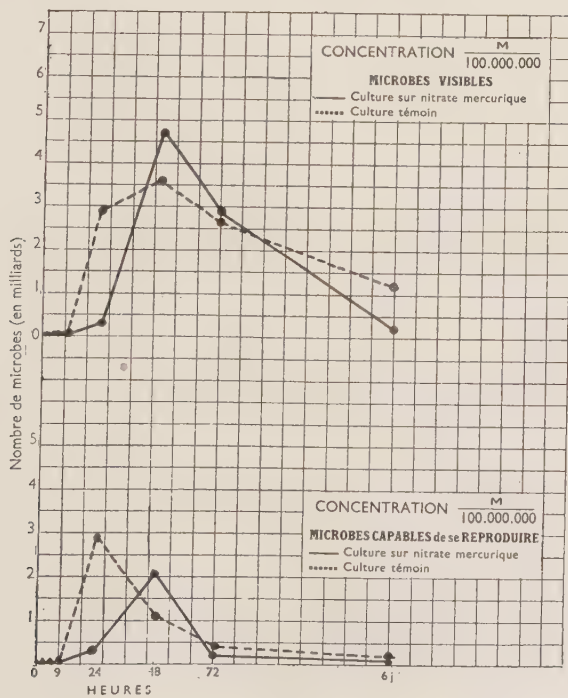
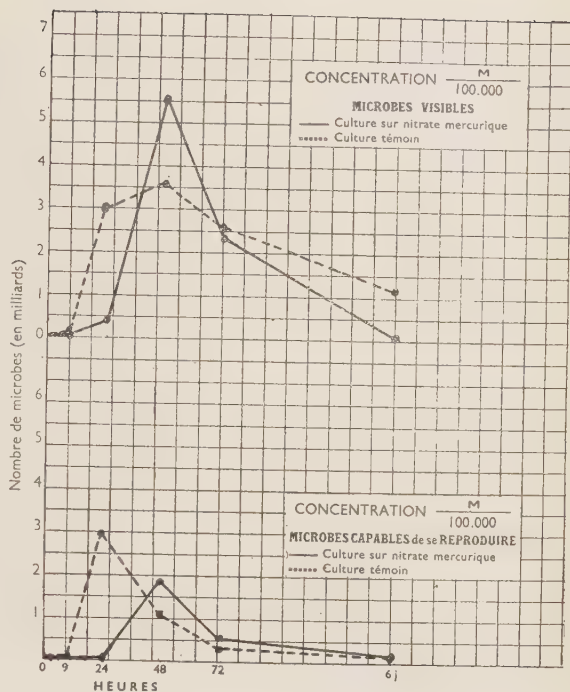
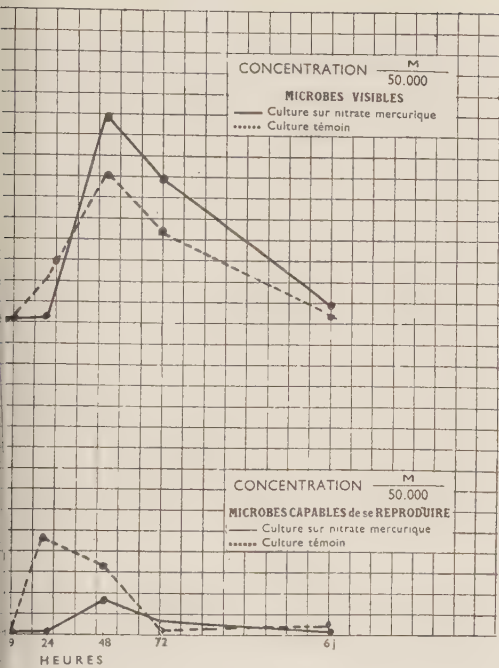
MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin	Culture sur nitrate mercurique	Culture témoin
0 h	0,163	0,283	5,21	5,45				
3 h	0,056	0,660	4,75	5,81	-1,5	1,2	(120)	150
6 h	0,228	4,3	5,35	6,63	2	2,7	90	66
9 h	1,0	156,0	6,02	8,19	2,2	5,2	81	34
24 h	258,0	2830,0	8,41	9,45	7,9	4,2	113	214
48 h	2000,0	1030,0	9,30	9,01	2,9	-1,4	496	(1028)
72 h	190,0	389,0	8,27	8,58	-3,4	-1,4	(423)	(1028)
6 jours	156,6	193,0	8,19	8,28	-0,2	-1,0	(7200)	(4320)

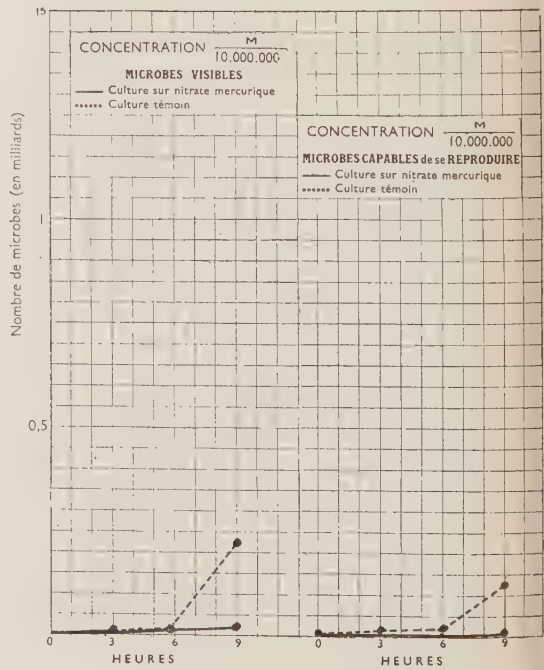
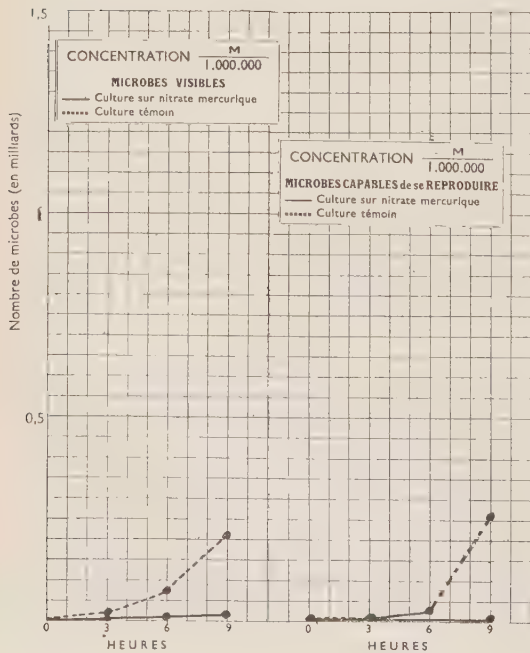
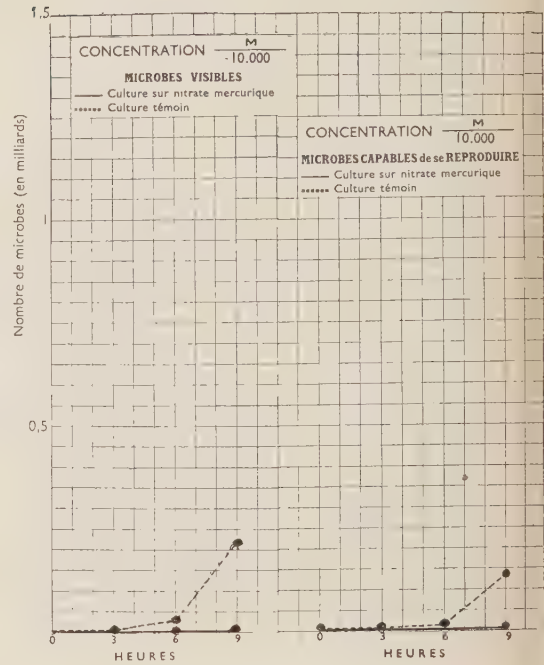
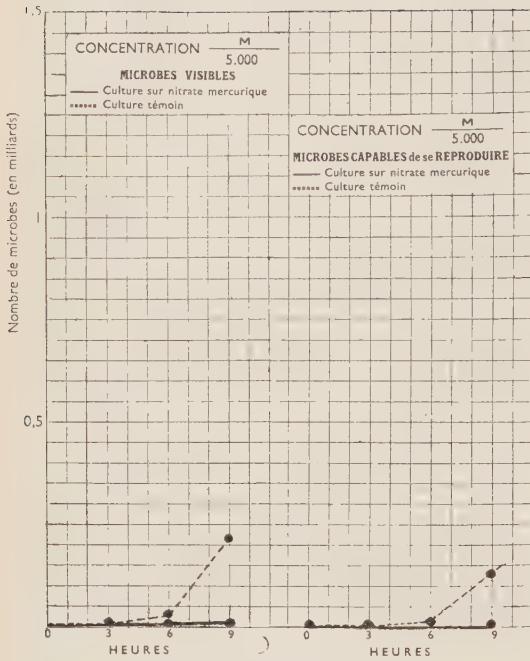
Courbes des nombres de Microbes



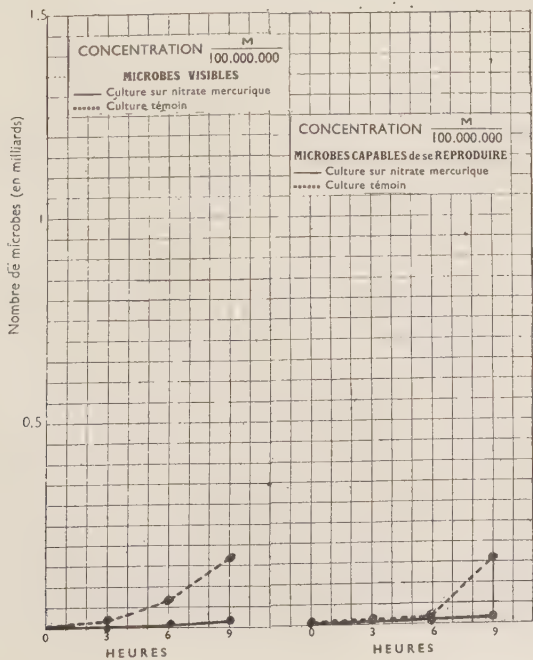
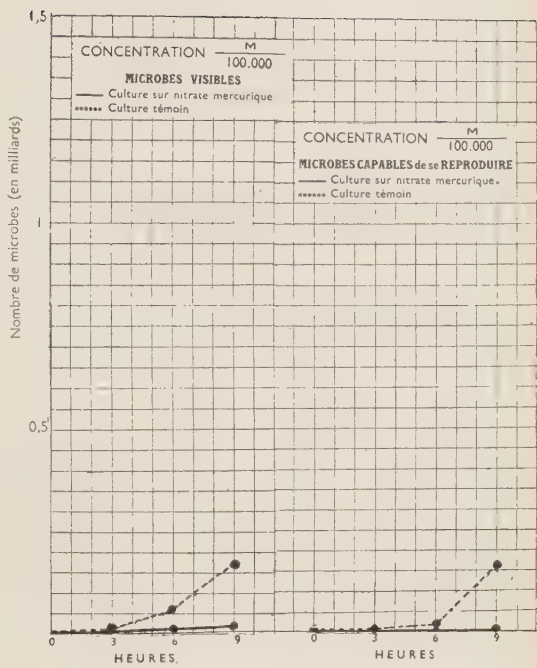
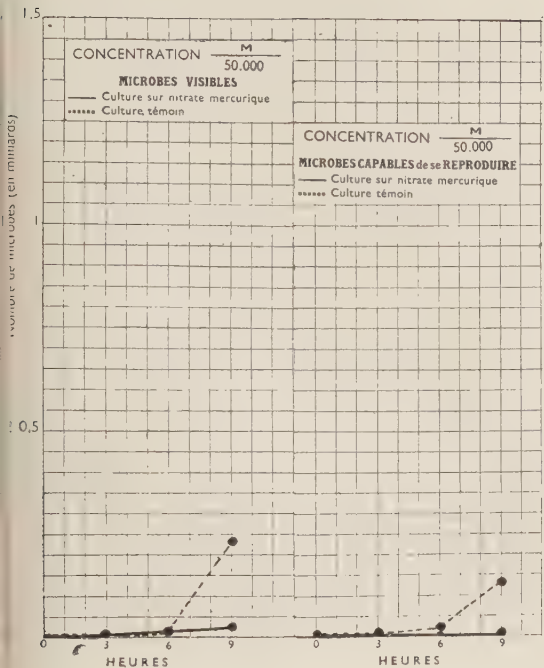
en fonction du temps



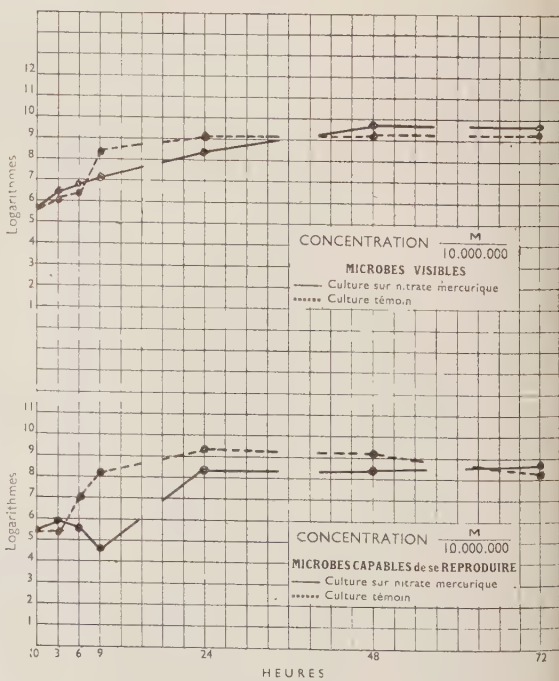
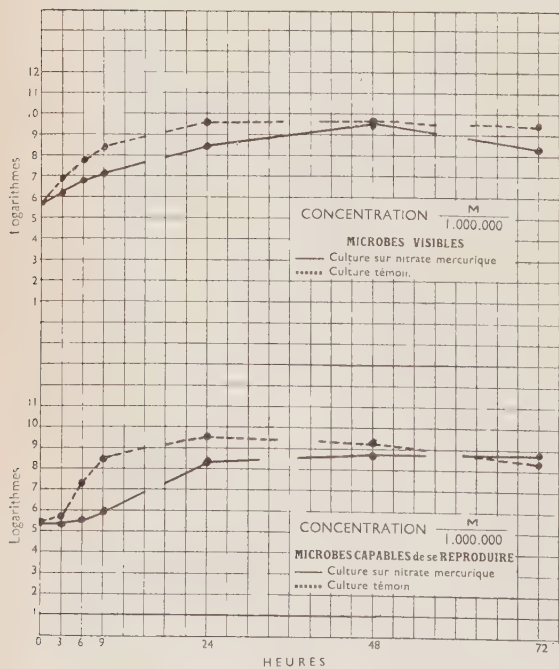
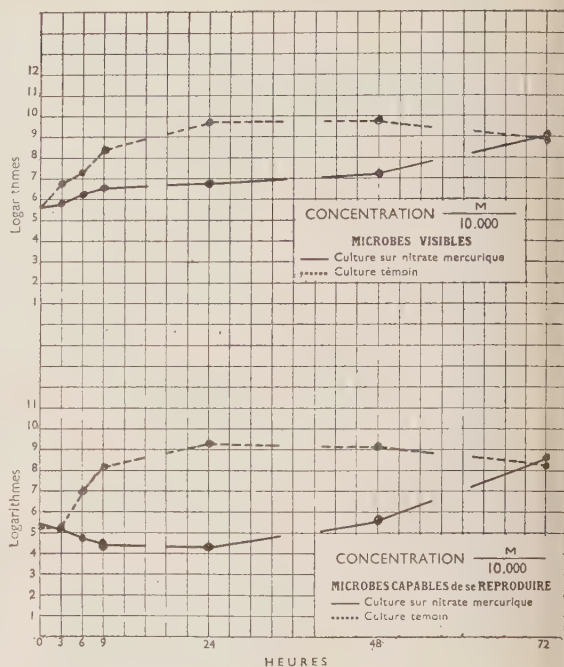
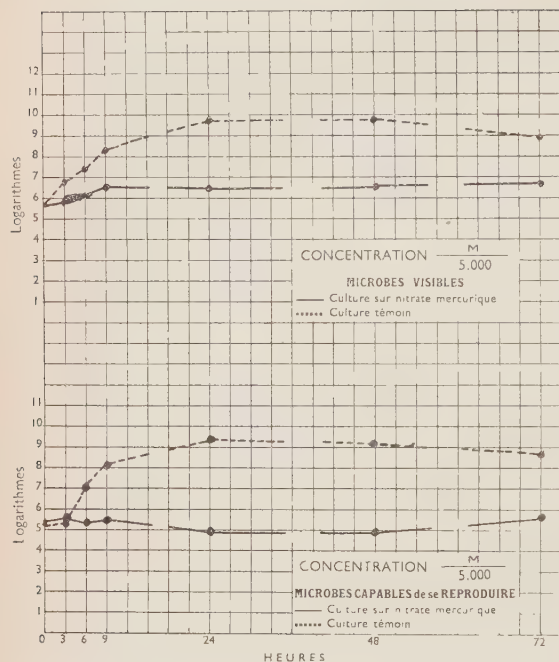
Courbes des nombres de Microbes (Premières heures)



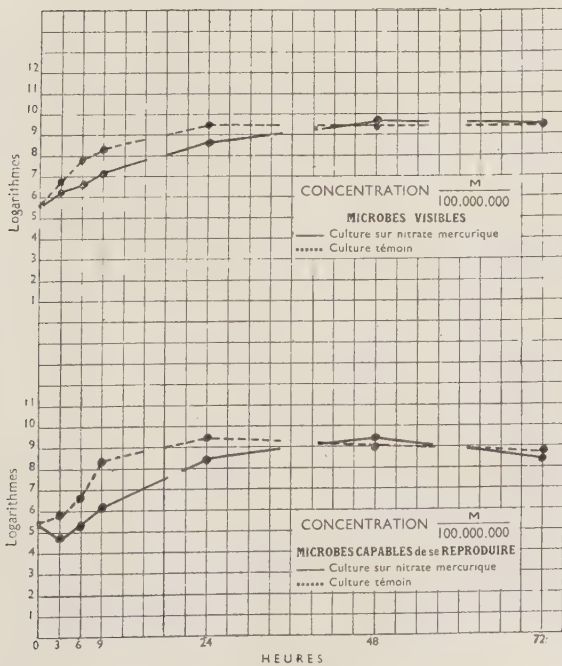
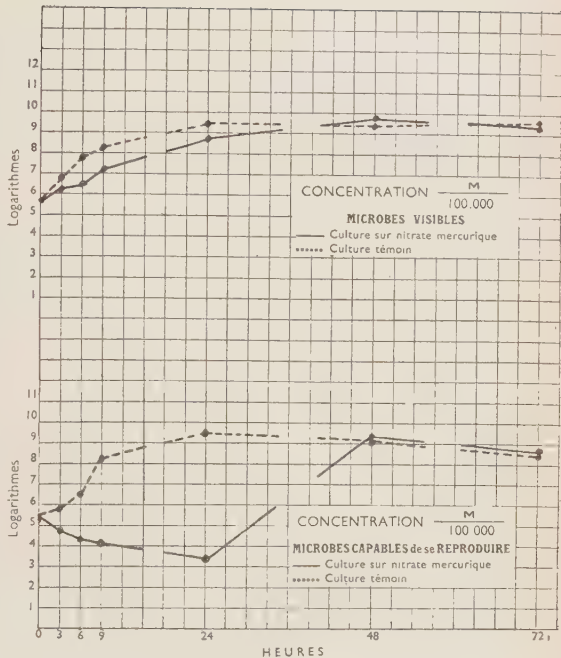
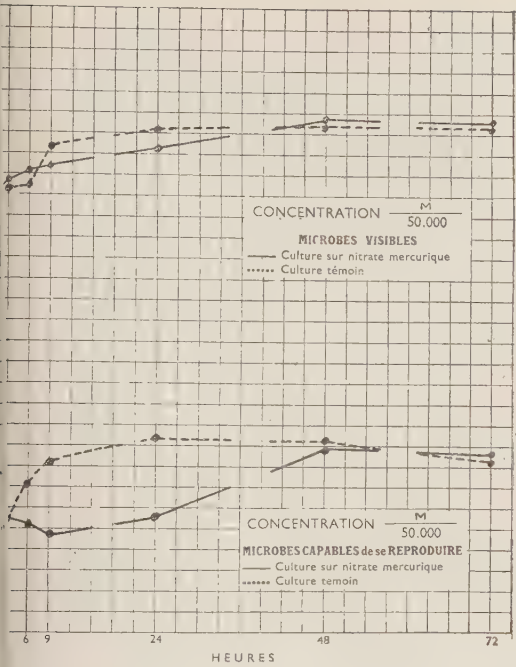
en fonction du temps
de la multiplication)



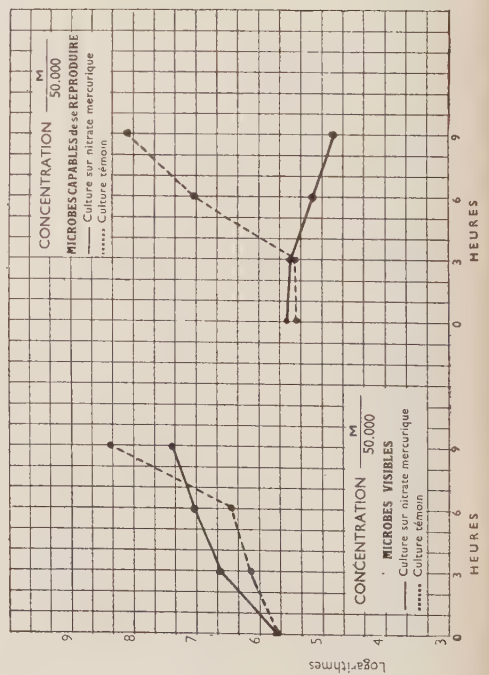
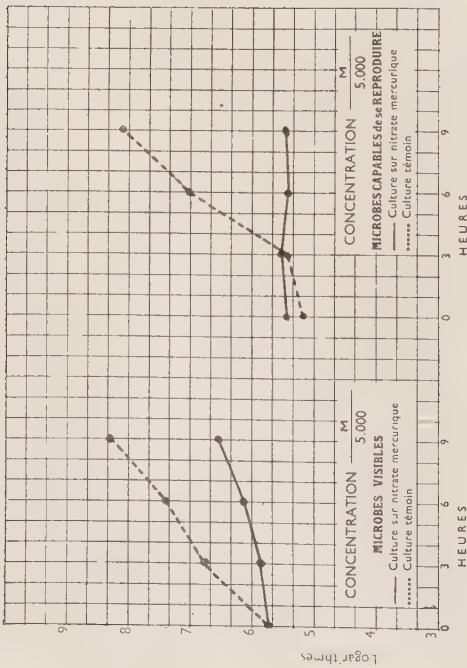
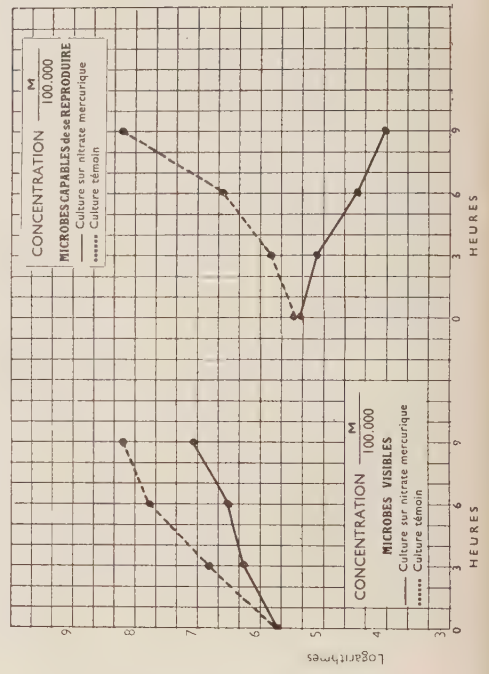
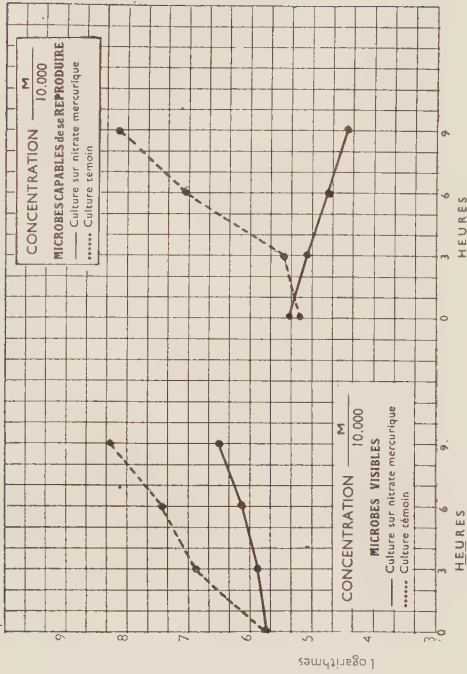
Courbes des logarithmes des nombres



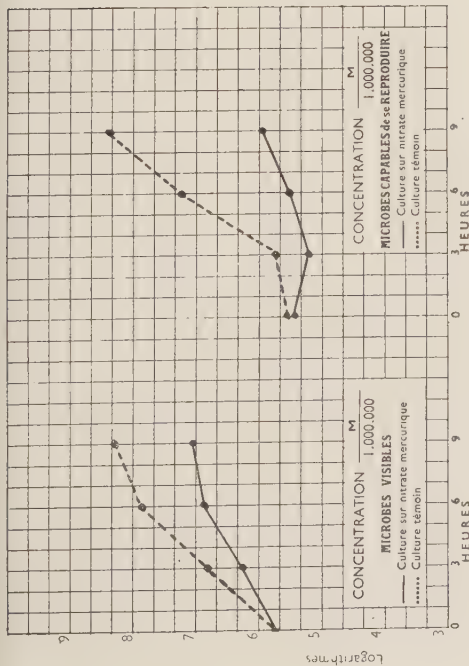
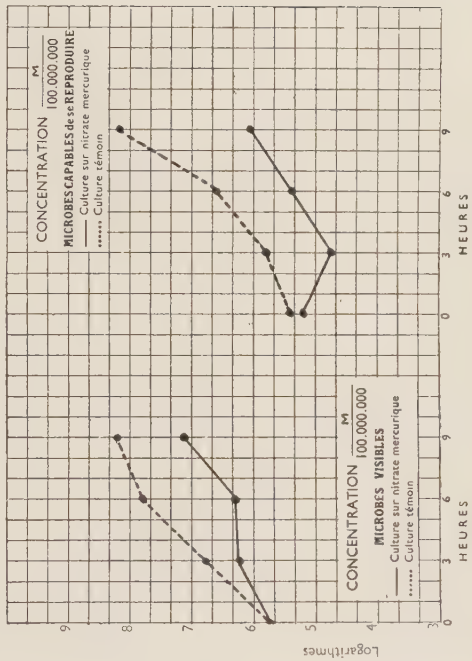
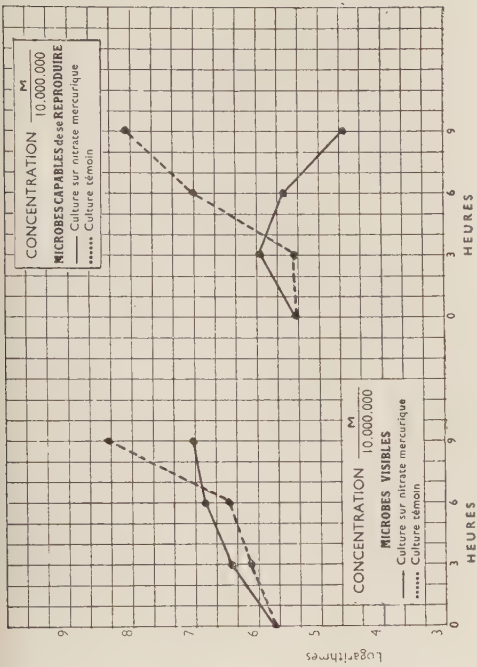
Microbes en fonction du temps



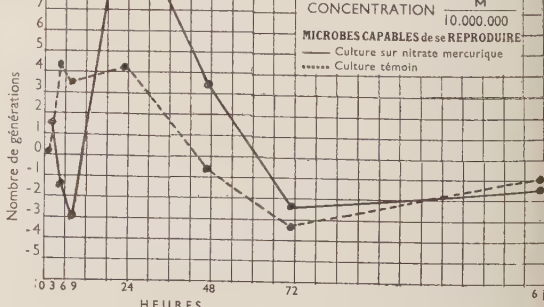
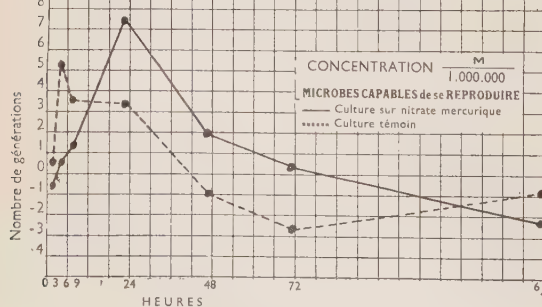
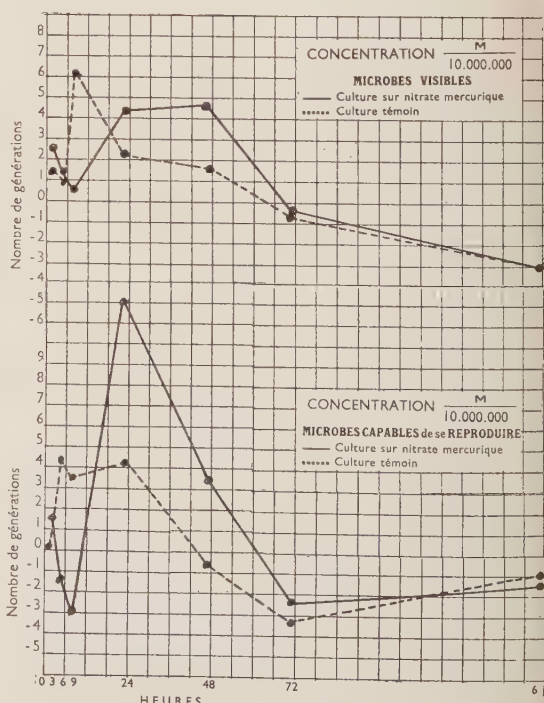
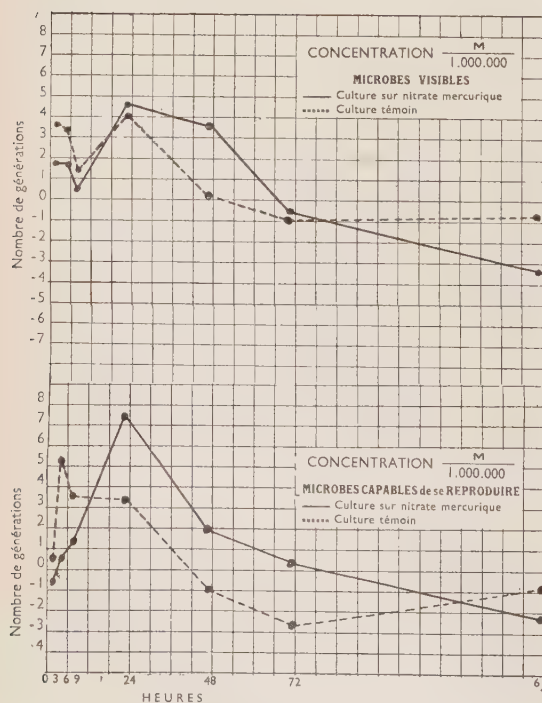
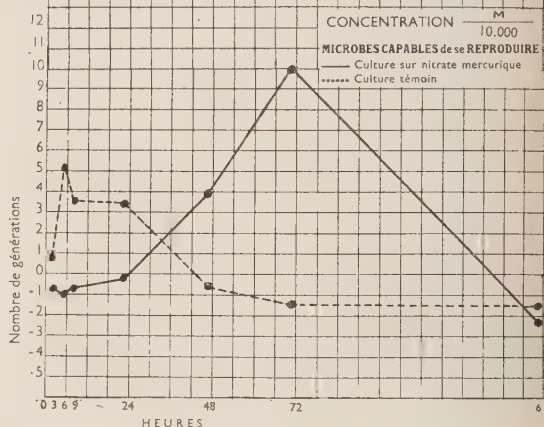
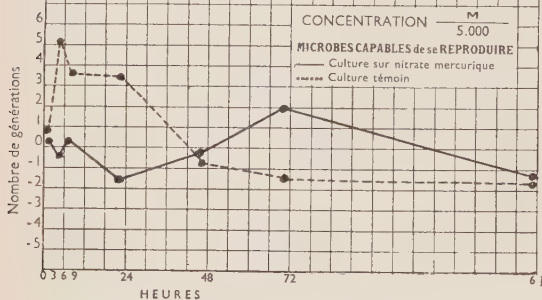
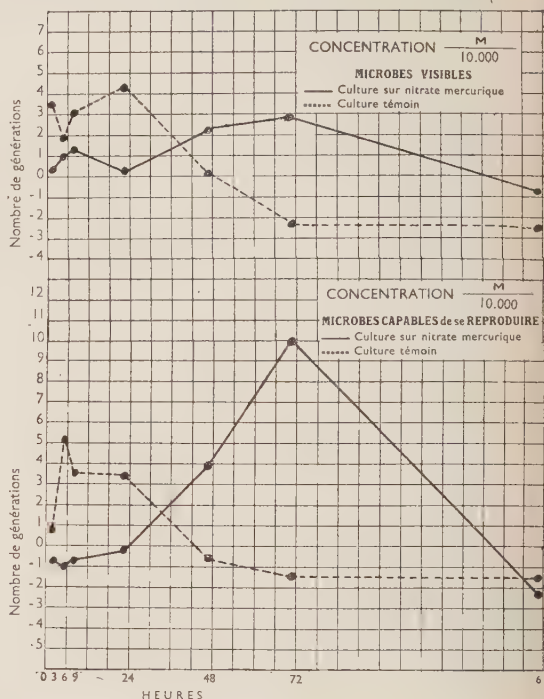
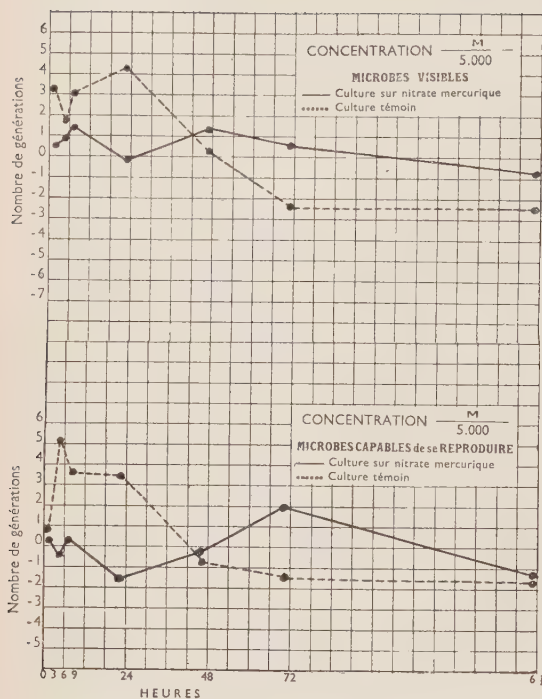
Courbes des logarithmes des nombres (Premières heures)



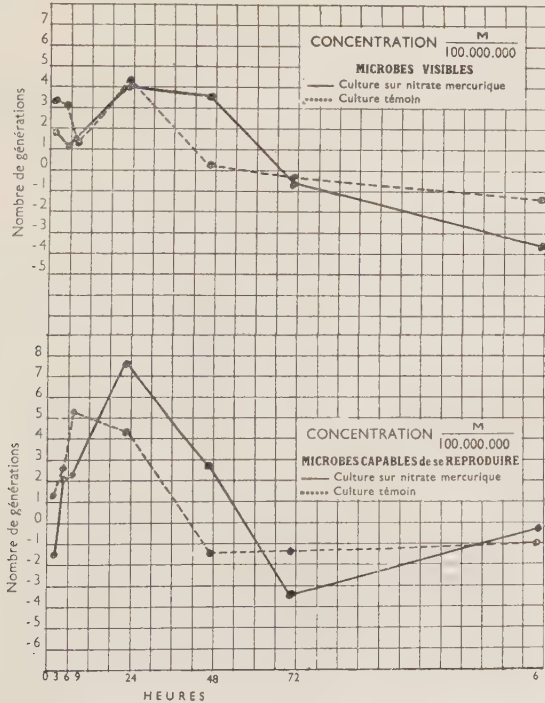
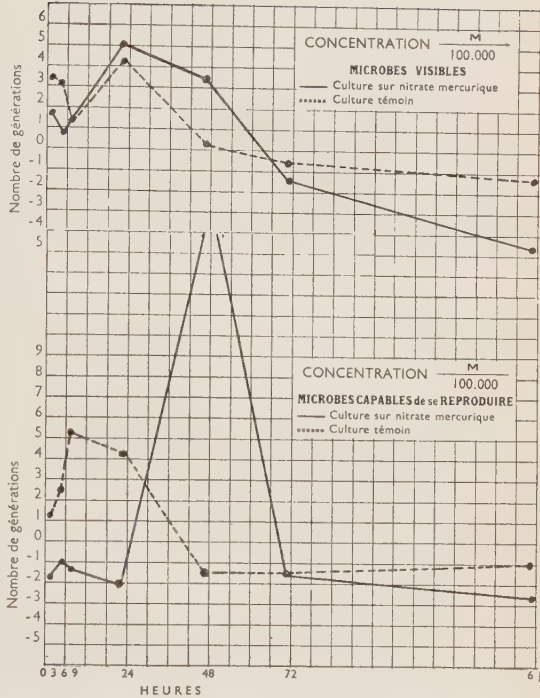
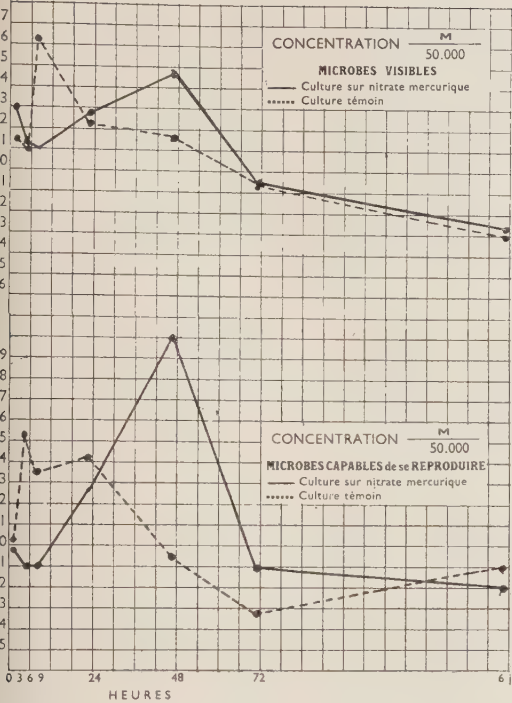
de Microbes en fonction du temps
de la multiplication)



Courbes des nombres de Générations

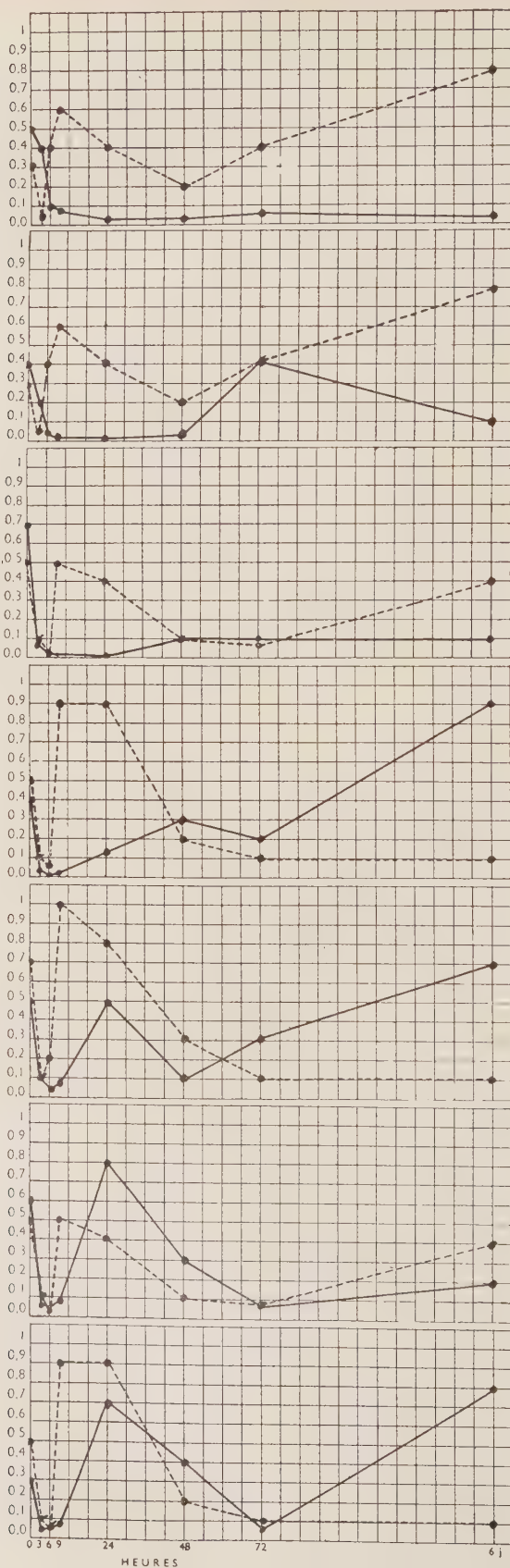


en fonction du temps



Courbes des Rapports de Vitalité en fonction du temps

Nombre de Microbes capables de se reproduire
 ————
 Nombre de Microbes visibles
 ————
 RAPPORT DE VITALITÉ =



Concentration M/5.000

Concentration M/10.000

Concentration M/50.000

Concentration M/100.000

Concentration M/1.000.000

Concentration M/10.000.000

Concentration M/100.000.000

V

ACTION DU NITRATE
D'ARGENT

CONCENTRATION M/5.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	173.000	223.000
3 h	1.104.000	10.350.000	43.000	380.000
6 h	1.380.000	124.840.000	57.300	11.850.000
9 h	2.415.000	329.000.000	7.100	120.860.000
24 h	3.036.000	3.589.000.000	66	2.400.000.000
48 h	11.040.000	4.622.000.000	0	1.230.000.000
72 h	3.381.000	1.380.000.000	0	910.000.000
6 jours	960.000	985.000.000	0	233.000.000

CONCENTRATION M/10.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	230.000	223.000
3 h	1.656.000	10.350.000	300.000	380.000
6 h	9.384.000	124.840.000	12.300	11.850.000
9 h	4.071.000	329.000.000	121.300	120.860.000
24 h	2.666.000	3.589.000.000	190.000	2.400.000.000
48 h	897.000.000	4.622.000.000	101.000.000	1.230.000.000
72 h	712.000.000	1.380.000.000	493.000.000	910.000.000
6 jours	669.600.000	985.000.000	246.000.000	233.000.000

CONCENTRATION M/100.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	316.000	286.000
3 h	1.995.000	13.125.000	666.000	430.000
6 h	9.975.000	189.000.000	486.000	15.000.000
9 h	11.970.000	525.000.000	537.300	125.900.000
24 h	35.910.000	4.305.000.000	543.000	2.600.000.000
48 h	1.569.600.000	4.592.000.000	446.000.000	1.726.000.000
72 h	2.692.000.000	1.584.000.000	730.000.000	1.060.000.000
6 jours	993.600.000	1.368.000.000	250.000.000	345.000.000

CONCENTRATION M/500.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	233.000	310.000
3 h	3.535.000	10.100.000	240.000	1.320.000
6 h	30.300.000	80.800.000	670.000	23.430.000
9 h	525.200.000	1.212.000.000	17.660.000	234.000.000
24 h	1.160.000.000	3.030.000.000	1.010.000.000	2.460.000.000
48 h	666.000.000	6.150.000.000	133.000.000	1.560.000.000
72 h	202.000.000	5.126.000.000	13.000.000	1.060.000.000
6 jours	404.000.000	2.150.000.000	8.430.000	700.000.000

CONCENTRATION M/1.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	263.000	310.000
3 h	2.020.000	10.100.000	350.000	1.320.000
6 h	40.400.000	80.800.000	716.000	23.430.000
9 h	585.800.000	1.212.000.000	20.200.000	234.000.000
24 h	1.450.000.000	3.030.000.000	1.333.200.000	2.460.000.000
48 h	868.600.000	6.150.000.000	100.000.000	1.560.000.000
72 h	121.200.000	5.126.000.000	13.000.000	1.060.000.000
6 jours	282.000.000	2.150.000.000	900.000	700.000.000

CONCENTRATION M/5.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ²)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ²) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	196.000	310.000
3 h	3.535.000	10.100.000	246.000	1.320.000
6 h	34.340.000	80.800.000	473.000	23.430.000
9 h	323.200.000	1.212.000.000	21.300.000	234.000.000
24 h	1.414.000.000	3.030.000.000	1.300.000.000	2.460.000.000
48 h	929.200.000	6.150.000.000	130.000.000	1.560.000.000
72 h	141.400.000	5.126.000.000	9.000.000	1.060.000.000
6 jours	464.600.000	2.150.000.000	9.300.000	700.000.000

CONCENTRATION M/10.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	190.000	270.000
3 h	3.289.000	6.452.000	250.000	1.046.000
6 h	4.290.000	77.100.000	510.460	8.260.000
9 h	13.156.000	925.000.000	6.000.000	120.000.000
24 h	1.401.400.000	5.412.000.000	1.290.000.000	3.760.000.000
48 h	3.146.000.000	5.980.000.000	1.886.000.000	2.930.000.000
72 h	3.718.000.000	4.500.000.000	1.163.000.000	1.990.000.000
6 jours	2.290.000.000	2.900.000.000	843.000.000	320.000.000

CONCENTRATION M/100.000.000

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE GERMES VISIBLES APRÈS COLORATION SUR LAME (PAR CM ³)		NOMBRE DE GERMES CAPABLES DE SE REPRODUIRE (PAR CM ³) APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	500.000	500.000	260.000	270.000
3 h	6.452.000	6.452.000	376.000	1.046.000
6 h	77.100.000	77.100.000	1.400.000	8.260.000
9 h	925.000.000	925.000.000	8.600.000	120.000.000
24 h	5.412.000.000	5.412.000.000	505.000.000	3.760.000.000
48 h	5.980.000.000	5.980.000.000	1.875.000.000	2.930.000.000
72 h	4.500.000.000	4.500.000.000	1.410.000.000	1.990.000.000
6 jours	2.900.000.000	2.900.000.000	843.000.000	320.000.000

CONCENTRATION M/5.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	1,1	10,3	6,04	7,01	1	4,4	180	40
6 h	1,3	124,8	6,13	8,09	0,3	3,6	600	50
9 h	2,4	329,0	6,38	8,51	0,8	1,4	225	128
24 h	3,0	3589,0	6,48	9,55	0,3	3,4	300	264
48 h	11,0	4622,0	7,04	9,66	1,8	0,3	800	4800
72 h	3,3	1380,0	6,52	9,13	-1,7	-1,7	(800)	(847)
6 jours	0,9	985,0	5,98	8,99	-1,8	-0,4	(2400)	(10800)

CONCENTRATION M/5.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,173	0,223	5,23	5,34				
3 h	0,04	0,380	4,63	5,57	-2	0,7	(90)	257
6 h	0,05	11,8	4,75	7,07	0,4	5,0	450	36
9 h	0,007	120,8	3,85	8,07	-3	3,3	(60)	54
24 h	0	2400,0		9,38		4,3		209
48 h	0	1230,0		9,07		-1,0		(1440)
72 h	0	910,0		8,95		-0,4		(3800)
6 jours	0	233,0		8,36		-1,9		(2270)

CONCENTRATION M/10.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES (PAR CM ³) (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	1,6	10,3	6,21	7,01	1,7	4,4	107	40
6 h	9,3	124,8	6,97	8,09	2,5	3,6	72	50
9 h	4,0	329,0	6,60	8,51	-1,2	1,4	(150)	128
24 h	2,6	3589,0	6,42	9,55	-0,6	3,4	(1500)	264
48 h	897,0	4622,0	8,95	9,66	8,4	0,3	171	4800
72 h	712,0	1380,0	8,85	9,13	-0,3	-1,7	(4800)	(847)
6 jours	669,6	985,0	8,82	8,99	-0,1	-0,4	(43200)	(10800)

CONCENTRATION M/10.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,230	0,223	5,36	5,34				
3 h	0,300	0,380	5,47	5,57				
6 h	0,012	11,8	4,08	7,07	-4,6	5,0	(39)	36
9 h	0,121	120,8	5,08	8,07	3,3	3,3	54	54
24 h	0,190	2400,0	5,27	9,38	0,6	4,3	1500	209
48 h	101,0	1230,0	8,0	9,07	9,1	-1,0	157	(1440)
72 h	493,0	910,0	8,69	8,95	2,3	-0,4	626	(3800)
6 jours	246,0	233,0	8,39	8,36	-1	-1,9	(4320)	(2270)

CONCENTRATION M/100.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	1,9	13,1	6,29	7,11	2	4,7	90	38
6 h	9,9	189,0	6,99	8,27	2,3	3,5	78	51
9 h	11,9	525,0	7,07	8,72	0,2	1,5	900	120
24 h	35,9	4305,0	7,55	9,63	1,6	3,0	562	300
48 h	1569,9	4592,0	9,19	9,66	5,4	0,1	266	14400
72 h	2692,0	1584,0	9,42	9,19	0,7	-1,7	2057	(846)
6 jours	993,6	1368,0	8,99	9,13	-1,4	-0,2	(3085)	(21600)

CONCENTRATION M/100.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,316	0,286	5,49	5,45				
3 h	0,666	0,430	5,82	5,63	1	0,6	180	300
6 h	0,486	15,0	5,68	7,7	-0,4	5,1	(450)	35
9 h	0,537	125,9	5,72	8,09	0,1	3,6	1800	50
24 h	0,543	2600,0	5,73	9,41	-0,03	4,4	(30000)	204
48 h	446,0	1726,0	8,64	9,23	9,7	-0,6	445	(2400)
72 h	730,0	1060,0	8,86	9,02	0,7	-0,7	2057	(2057)
6 jours	250,0	345,3	8,39	8,53	-1,5	-1,6	(2866)	(2700)

CONCENTRATION M/500.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69	2,8	4,3	64	41
3 h	3,5	10,1	6,54	7,00	3	3	60	60
6 h	30,3	80,8	7,48	7,90	4	3,9	45	46
9 h	525,2	1212,0	8,72	9,08	0,9	1,3	1000	692
24 h	1160,0	3030,0	9,00	9,48	-0,6	1	(2400)	1440
48 h	666,0	6150,0	8,82	9,78	-1,7	-0,2	(846)	(7200)
72 h	202,0	5126,0	8,30	9,70	1	-1,2	4320	(3600)
6 jours	404,0	2150,0	8,60	9,33				

CONCENTRATION M/500.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,233	0,310	5,36	5,49	0,06	2	3000	90
3 h	0,240	1,3	5,38	6,12	1,4	4	128	45
6 h	0,670	23,4	5,82	7,36	4,7	3	38	60
9 h	17,6	234,0	7,24	8,36	6	3,4	150	265
24 h	1010,0	2460,0	9,06	9,39	-3	-0,6	(480)	(2400)
48 h	133,0	1560,0	8,12	9,19	-3,3	-0,4	(436)	(3600)
72 h	13,0	1060,0	7,11	9,02	-0,6	-0,6	(7200)	(7200)
6 jours	8,4	700,0	6,92	8,84				

CONCENTRATION M/1.000.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	2,0	10,1	6,30	7,00	3	4,3	60	41
6 h	40,4	80,8	7,60	7,90	4,3	3	41	60
9 h	585,8	1212,0	8,76	9,08	3,8	3,9	48	46
24 h	1450,0	3030,0	9,16	9,48	1,2	1,3	750	692
48 h	868,6	6150,0	8,93	9,78	-0,6	1	(2400)	1440
72 h	121,2	5126,0	8,08	9,70	-2,8	-0,2	(540)	(7200)
6 jours	282,0	2150,0	8,46	9,33	1,2	-1,2	(3600)	(3600)

CONCENTRATION M/1.000.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,263	0,310	5,41	5,49				
3 h	0,350	1,3	5,54	6,12	0,4	2	450	90
6 h	0,716	23,4	5,86	7,36	1	4	180	45
9 h	20,2	234,0	7,30	8,36	4,8	3	37	60
24 h	1333,2	2460,0	9,12	9,39	6	3,4	150	265
48 h	100,0	1560,0	8,00	9,19	-3,8	-0,6	(378)	(2400)
72 h	13,0	1060,0	7,11	9,02	-2,9	-0,4	(496)	(3600)
6 jours	0,900	700,0	5,95	8,84	-3,8	-0,6	(1136)	(7200)

CONCENTRATION M/5.000.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69				
3 h	3,5	10,1	6,54	7,00	2,8	4,3	64	41
6 h	34,3	80,8	7,53	7,90	3	3	60	60
9 h	323,2	1212,0	8,50	9,08	3,2	3,9	56	46
24 h	1414,0	3030,0	9,14	9,48	2	1,3	450	692
48 h	929,2	6150,0	8,96	9,78	-0,6	1	(2400)	1440
72 h	141,4	5626,0	8,14	9,70	-2,7	-0,2	(533)	(7200)
6 jours	464,6	2150,0	8,66	9,33	1,7	-1,2	(2540)	(3600)

CONCENTRATION M/5.000.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,196	0,310	5,69	5,49				
3 h	0,246	1,3	5,39	6,12	0,3	2	600	90
6 h	0,473	23,4	5,67	7,36	0,9	4	200	45
9 h	243	234,0	7,51	8,36	2,8	3	64	60
24 h	1300,0	2460,0	9,11	9,39	2	3,4	450	266
48 h	130,0	1560,0	8,11	9,19	-3	-0,6	(480)	(2400)
72 h	9,0	1060,0	6,95	9,02	-3,8	-0,4	(378)	(3600)
6 jours	9,3	700,0	6,96	8,84	-0,03	-0,03	144.000	(7200)

CONCENTRATION M/10.000.000

MICROBES VISIBLES

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69	2,7	3	81	60
3 h	3,2	6,4	6,51	6,80	0,4	3,6	450	50
6 h	4,2	77,1	6,63	7,88	1,6	3,4	112	52
9 h	13,1	925,0	7,11	8,91	6,7	2,7	134	333
24 h	1401,4	5412,0	9,14	9,73	1	0,01	1440	144000
48 h	3146,0	5980,0	9,49	9,77	0,2	-0,2	7200	(7200)
72 h	3718,0	4500,0	9,56	9,65	-0,7	-0,6	(6171)	(7200)
6 jours	2290,0	2900,0	9,35	9,46				

CONCENTRATION M/10.000.000

MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS 'REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,190	0,270	5,27	5,53	0,4	1,9	450	90
3 h	0,250	1,0	5,39	6,01	1,0	3	180	60
6 h	0,510	8,2	5,70	6,91	3,5	3,8	51	47
9 h	6,0	120,0	6,77	8,07	7,8	5	115	180
24 h	1260,0	3760,0	9,11	9,57	0,5	-0,3	2880	(4800)
48 h	1886,0	2930,0	9,27	9,46	-0,7	-0,5	(2057)	(2880)
72 h	1163,0	1990,0	9,06	9,29	-4,6	-4	(9389)	(1080)
6 jours	843,0	320,0	8,92	8,50				

CONCENTRATION M/100.000.000

MICROBES VISIBLES

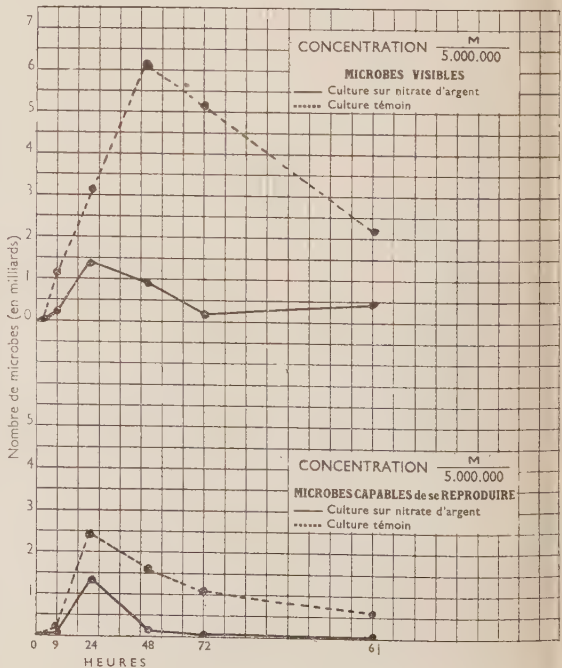
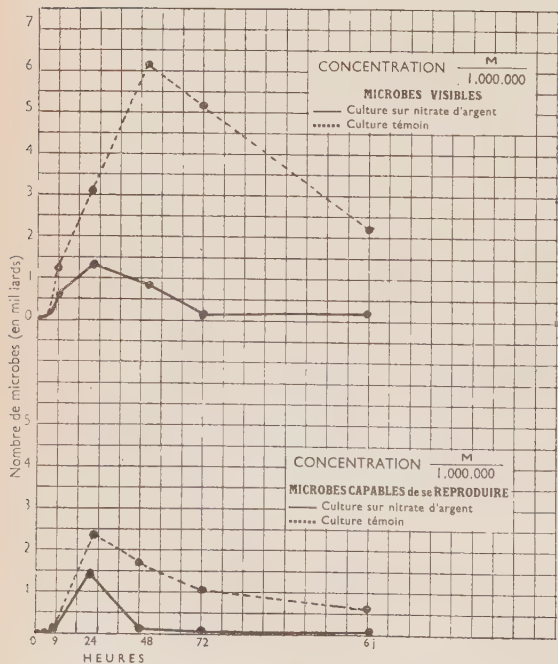
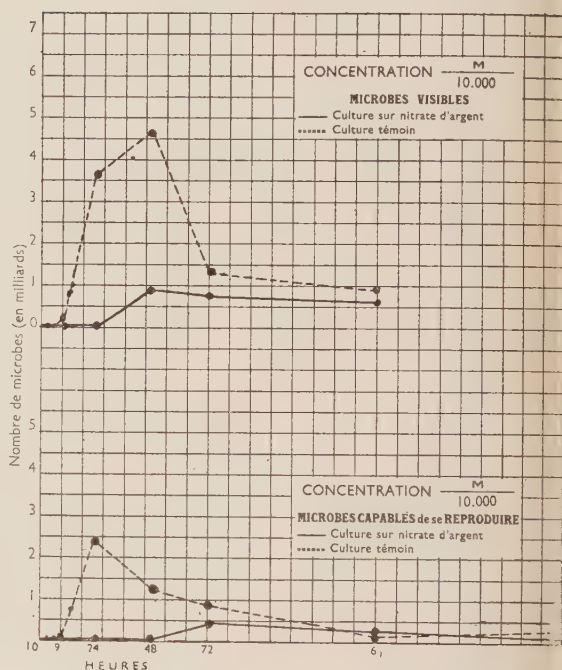
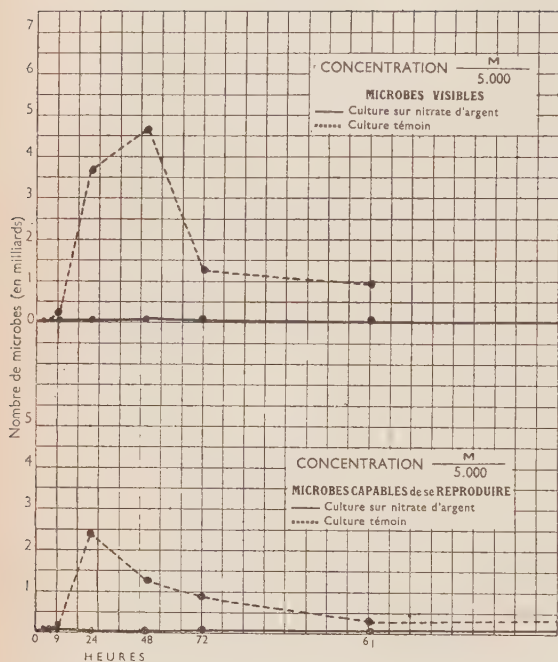
AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,500	0,500	5,69	5,69	3	3	60	60
3 h	4,2	6,4	6,63	6,80	0	3,6		50
6 h	4,2	77,1	6,63	7,88	1,4	3,4	128	52
9 h	11,4	925,0	7,05	8,91	6	2,7	150	333
24 h	915,2	5412,0	8,96	9,73	1,5	0,01	960	144000
48 h	2602,6	5980,0	9,41	9,77	0,7	-0,2	2057	(7200)
72 h	4290,9	4500,0	9,63	9,65	-0,3	-0,6	(14400)	(7200)
6 jours	3435,0	2900,0	9,53	9,46				

CONCENTRATION M/100.000.000

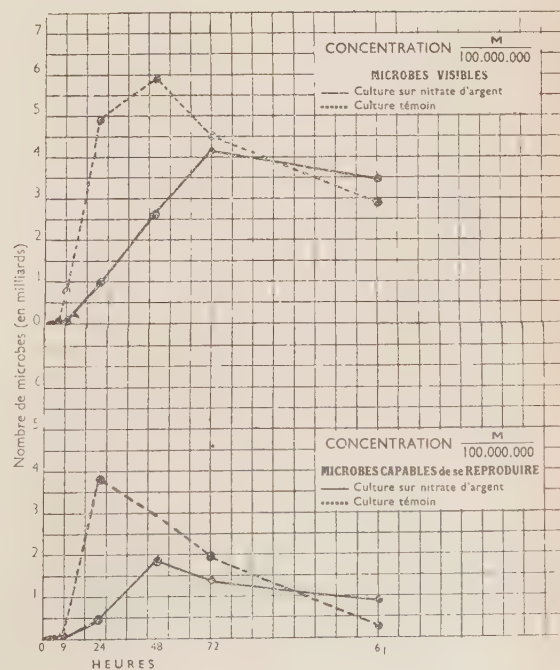
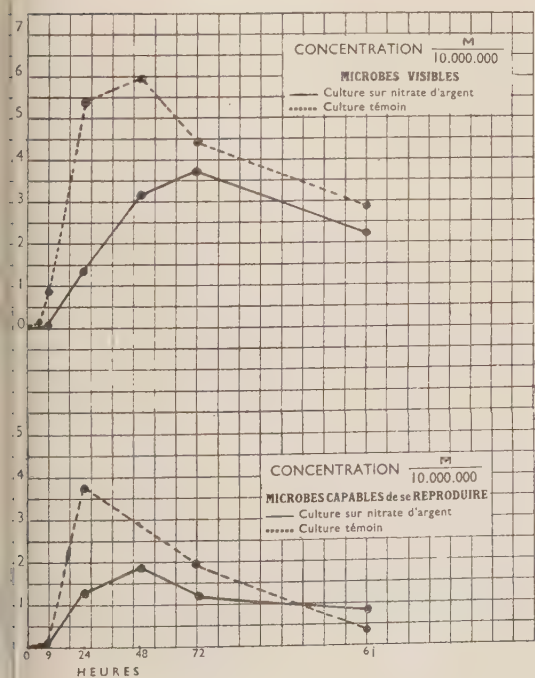
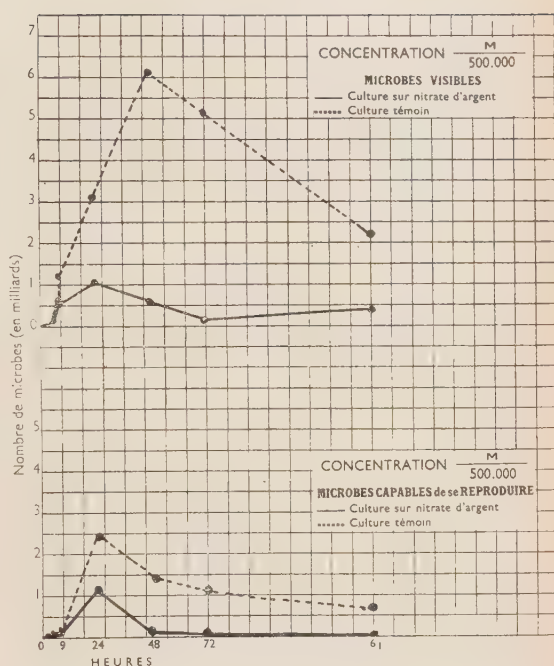
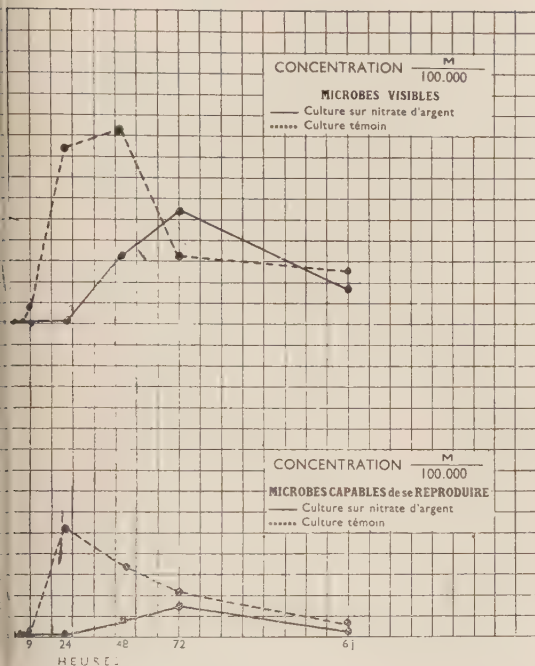
MICROBES CAPABLES DE SE REPRODUIRE APRÈS REPIQUAGE SUR GÉLOSE

AGE DE LA CULTURE	NOMBRE DE MICROBES PAR CM ³ (en millions)		LOGARITHMES DES NOMBRES DE MICROBES		NOMBRE DE GÉNÉRATIONS		TEMPS DE GÉNÉRATION (en minutes)	
	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin	Culture sur nitrate d'argent	Culture témoin
0 h	0,260	0,270	5,41	5,43	0,5	1,9	360	90
3 h	0,376	1,0	5,57	6,01	1,9	3	90	60
6 h	1,4	8,2	6,14	6,91	2,6	3,8	69	47
9 h	8,6	120,0	6,93	8,07	5,9	5	152	180
24 h	505,0	3760,0	8,70	9,57	1,9	-0,3	757	(4800)
48 h	1875,0	2930,0	9,27	9,46	-0,4	-0,5	(3800)	(2880)
72 h	1410,0	1990,0	9,14	9,29	-0,6	-4	(7200)	(1080)
6 jours	913,0	320,0	8,96	8,50				

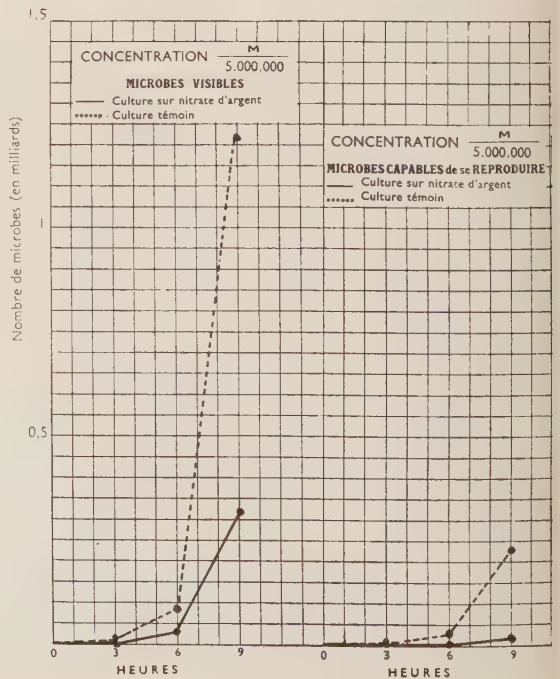
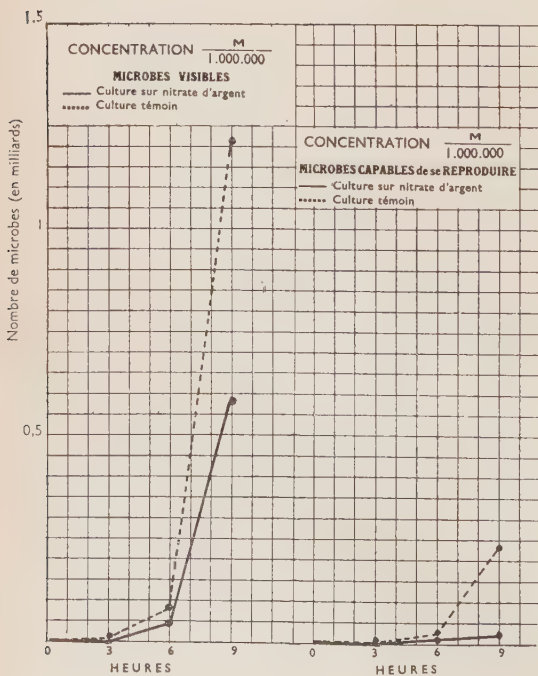
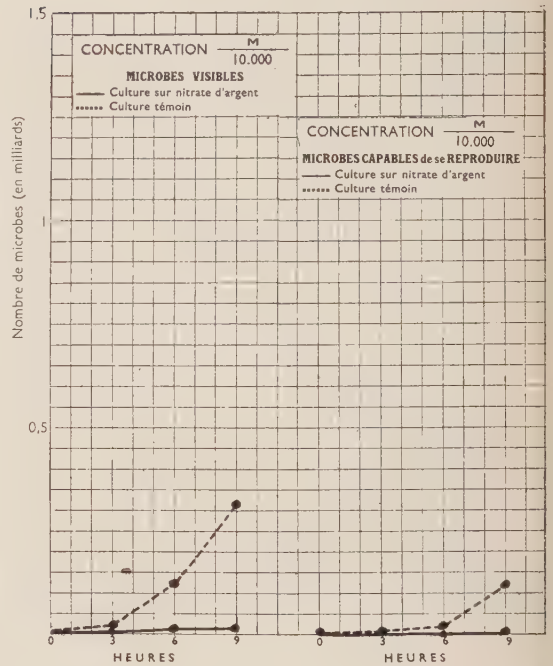
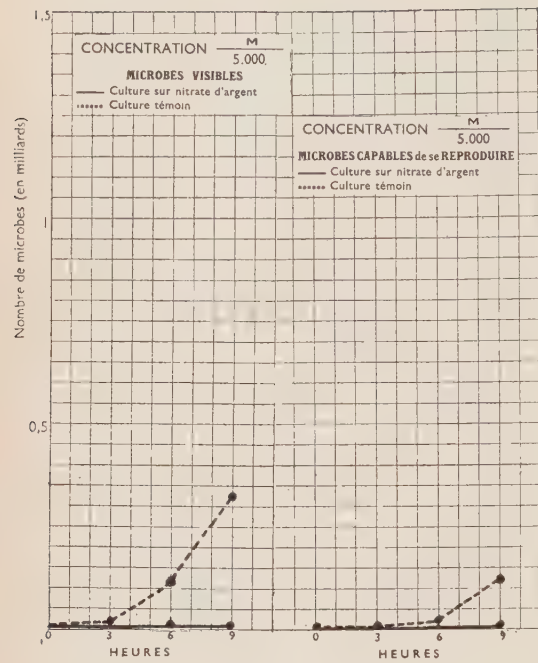
Courbes des nombres de Microbes



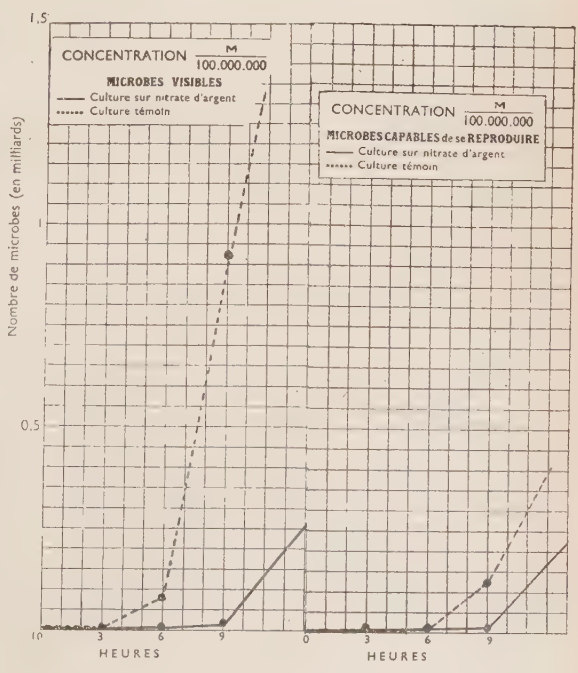
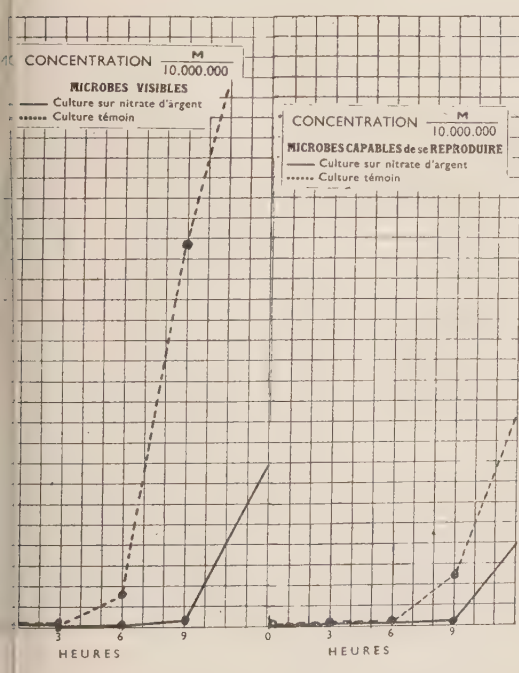
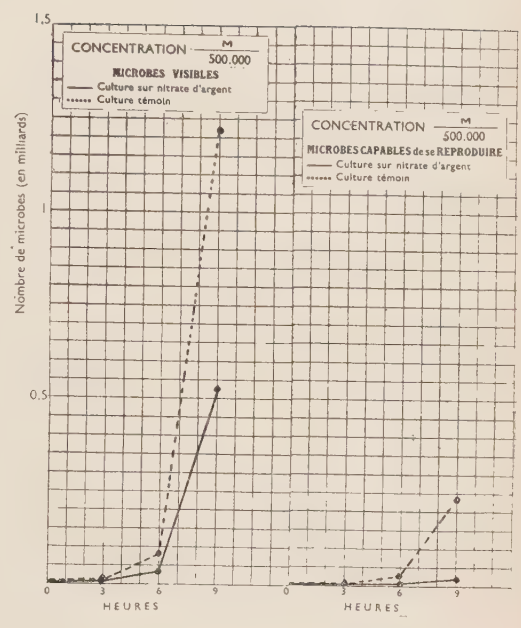
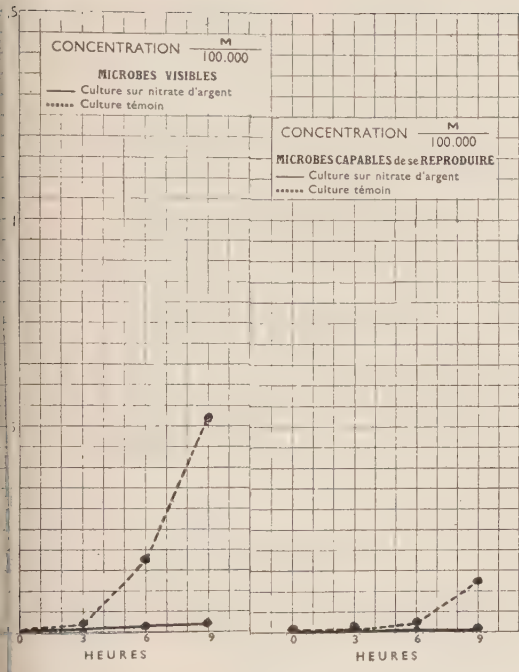
en fonction du temps



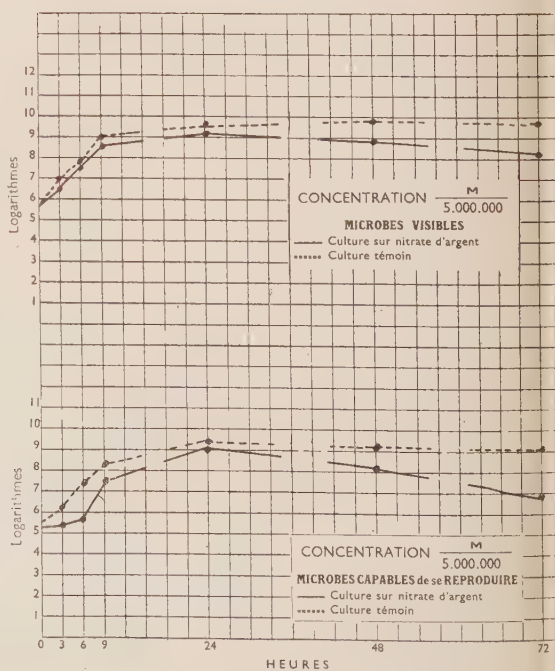
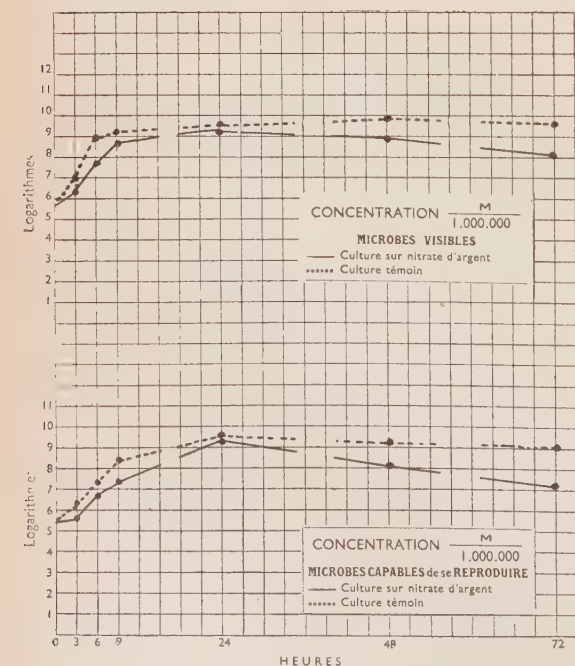
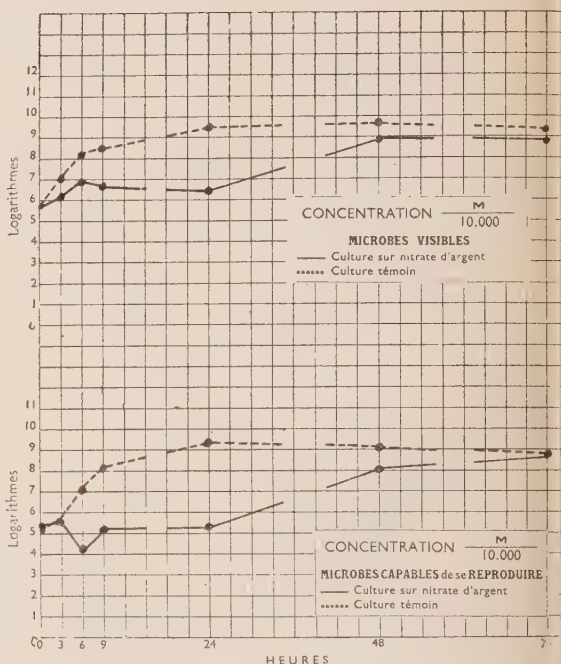
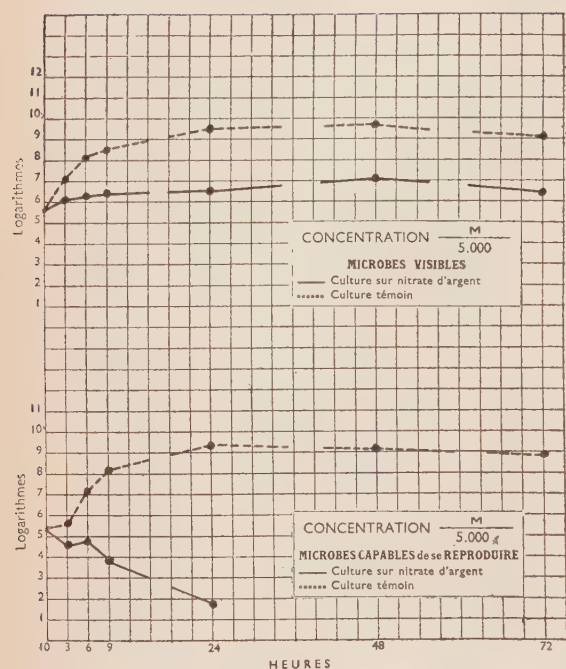
Courbes des nombres de Microbes (Premières heures)



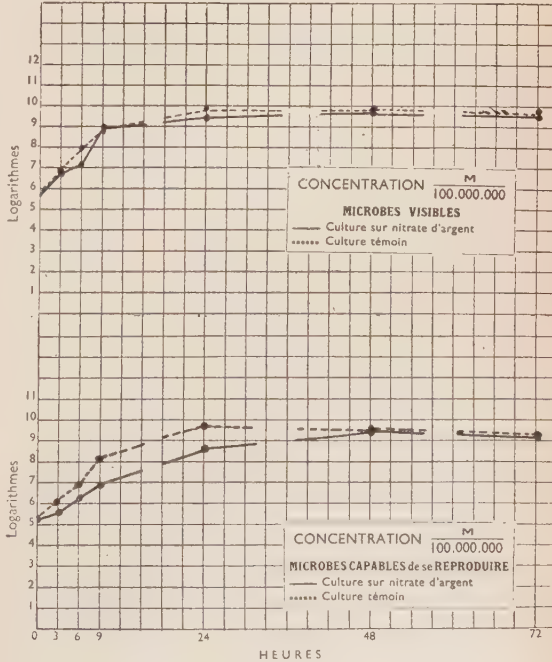
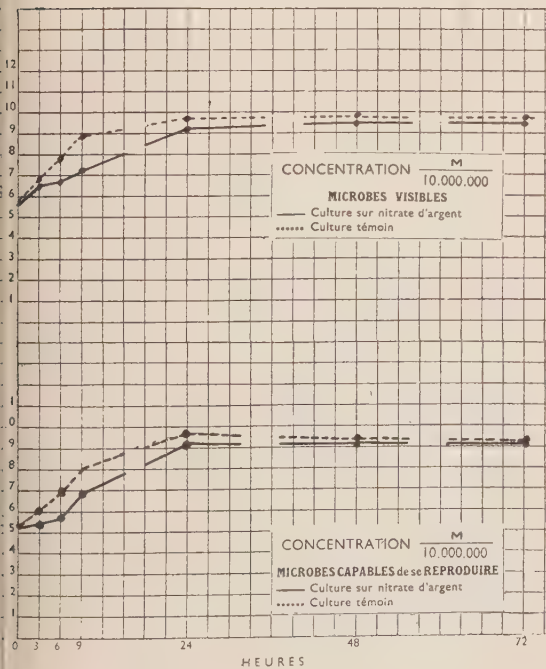
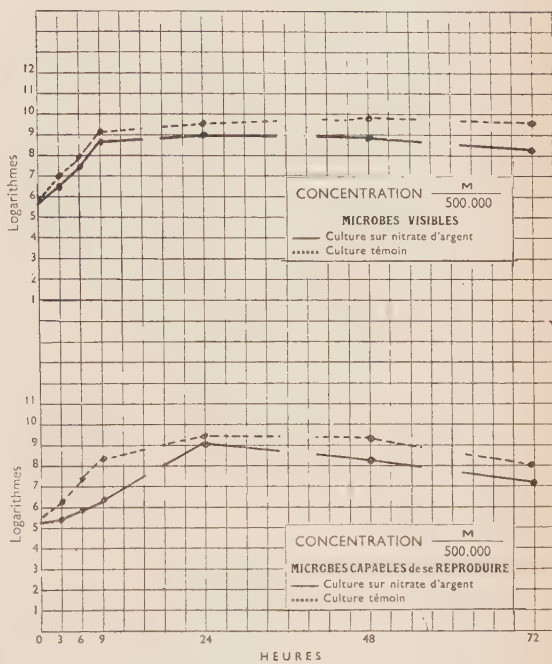
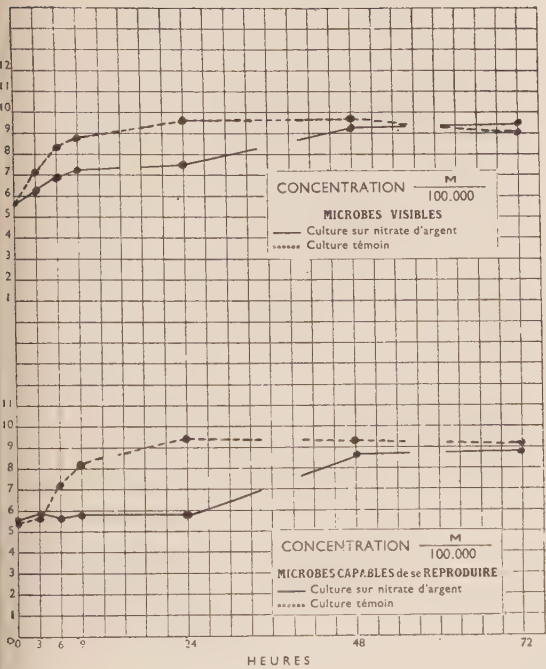
en fonction du temps de la multiplication)



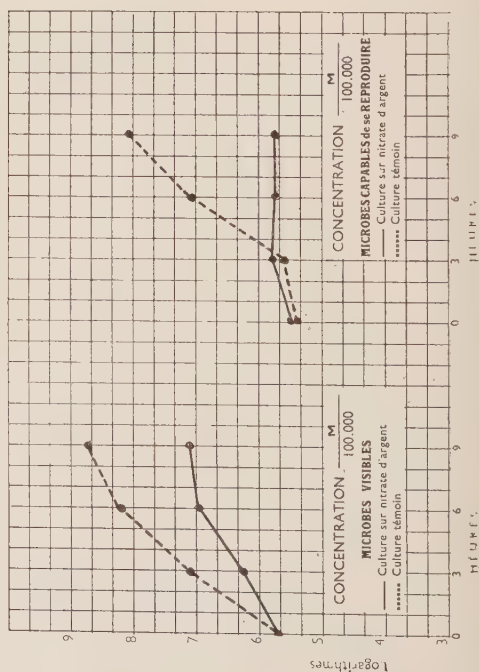
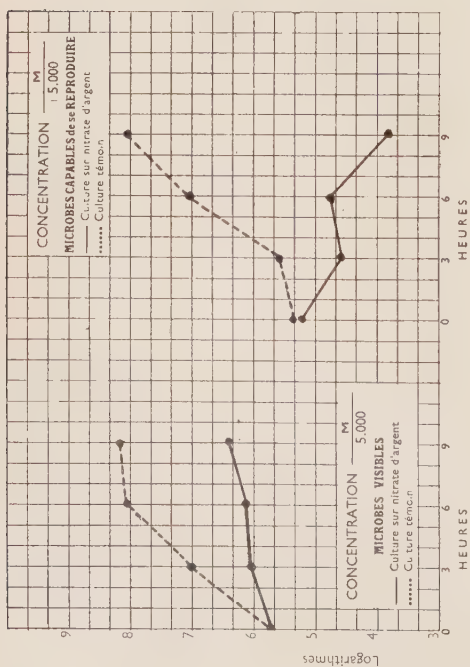
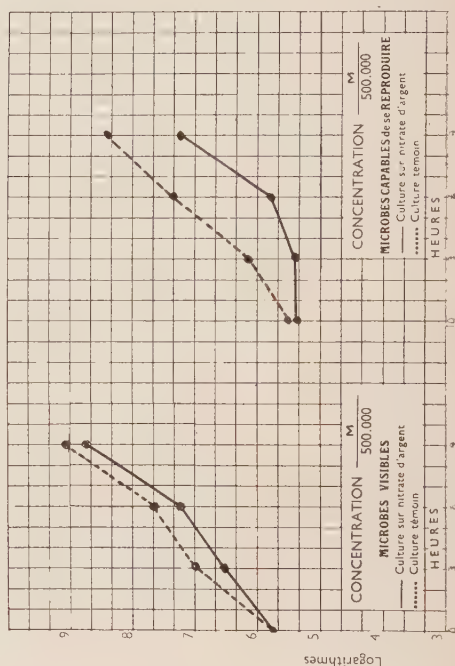
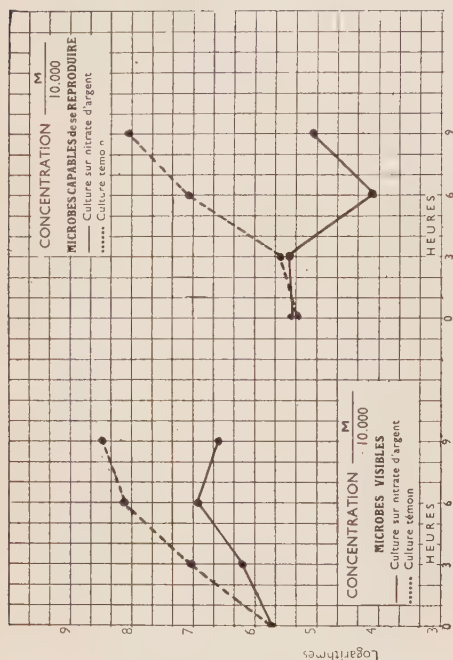
Courbes des logarithmes des nombres



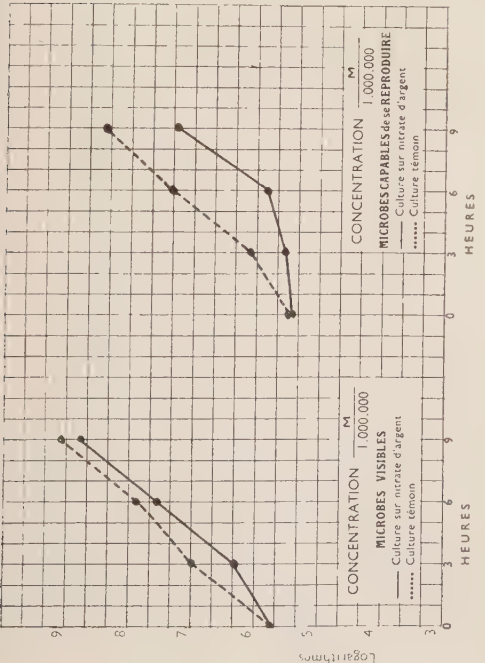
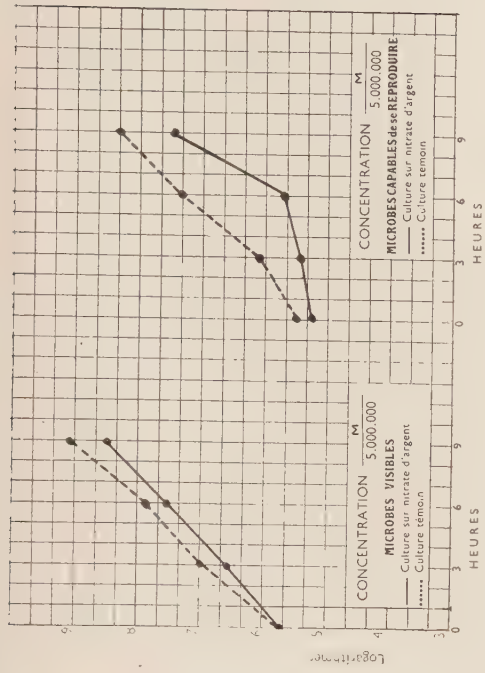
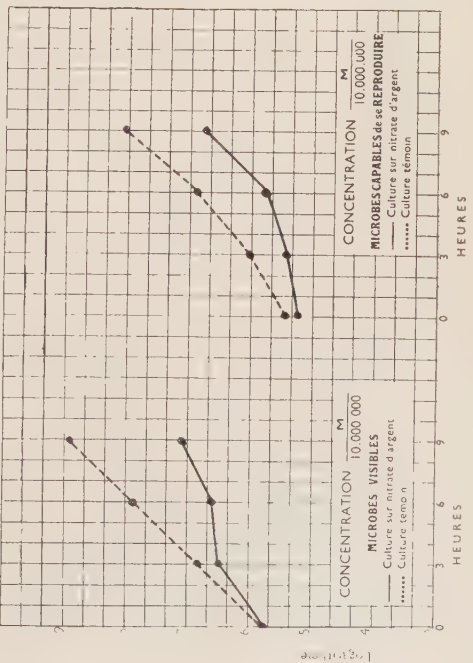
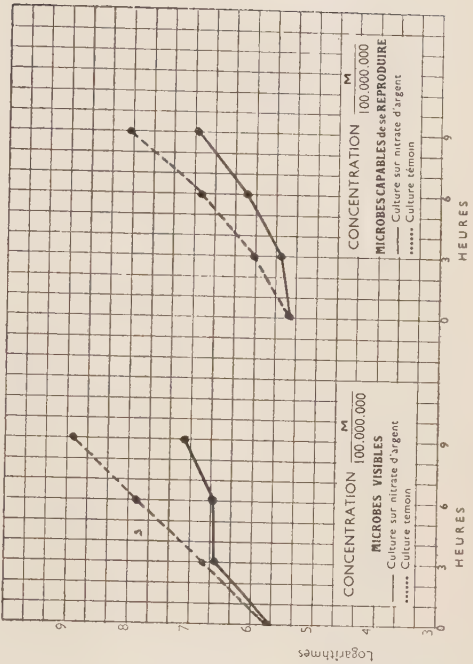
de Microbes en fonction du temps



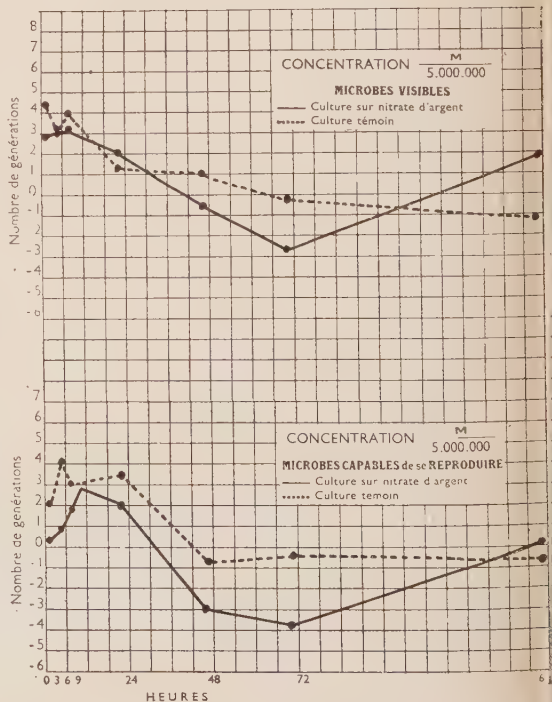
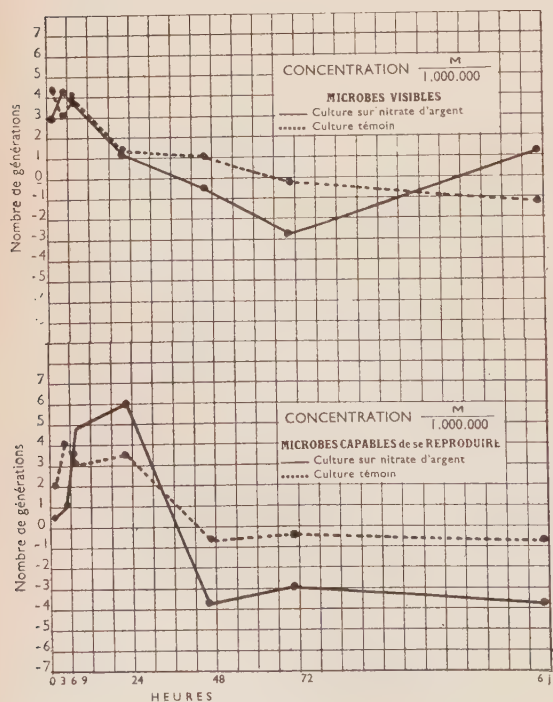
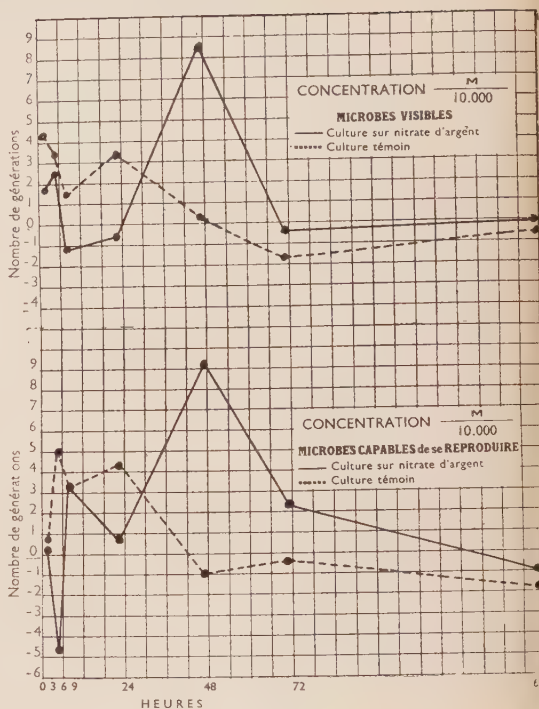
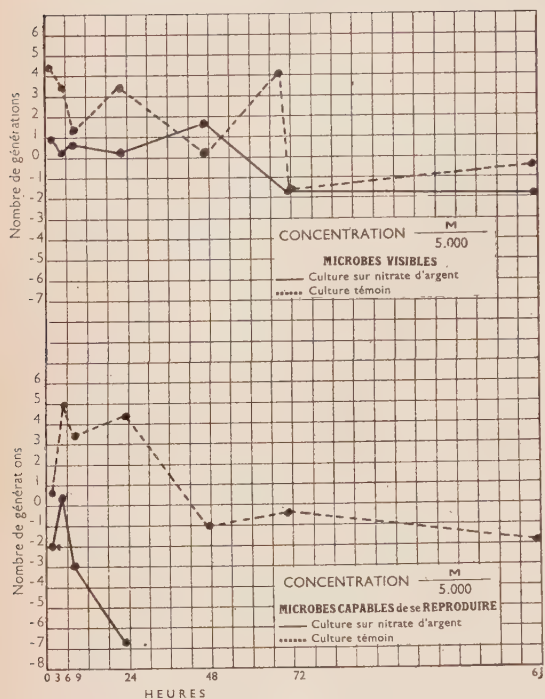
Courbes des logarithmes des nombres (Premières heures)



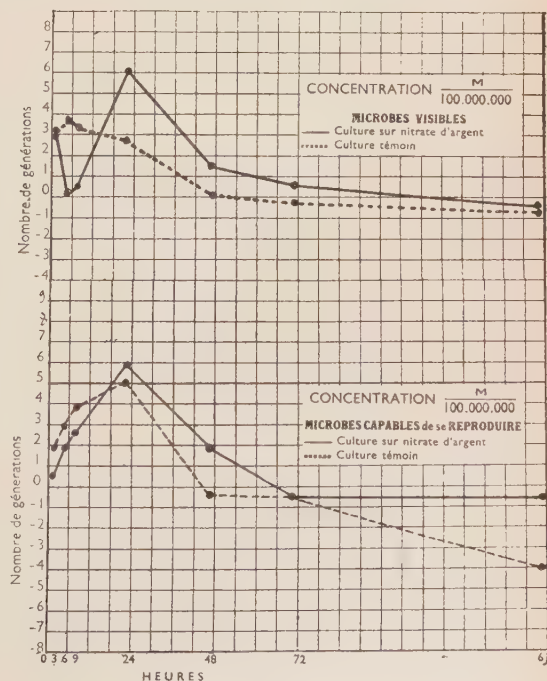
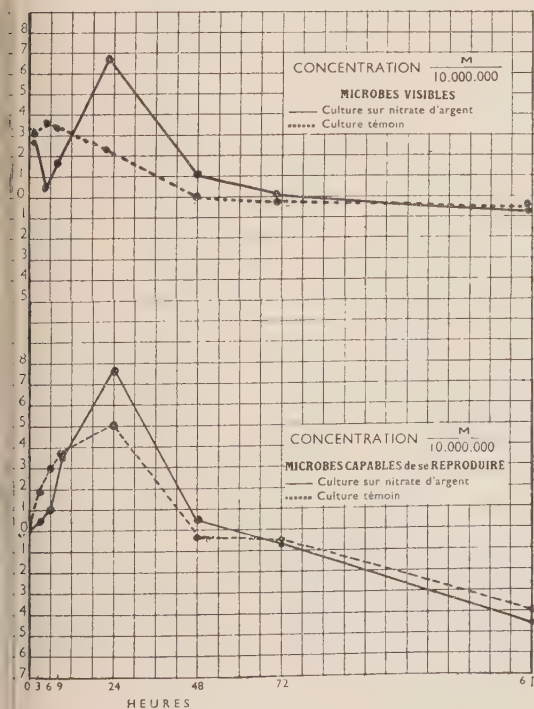
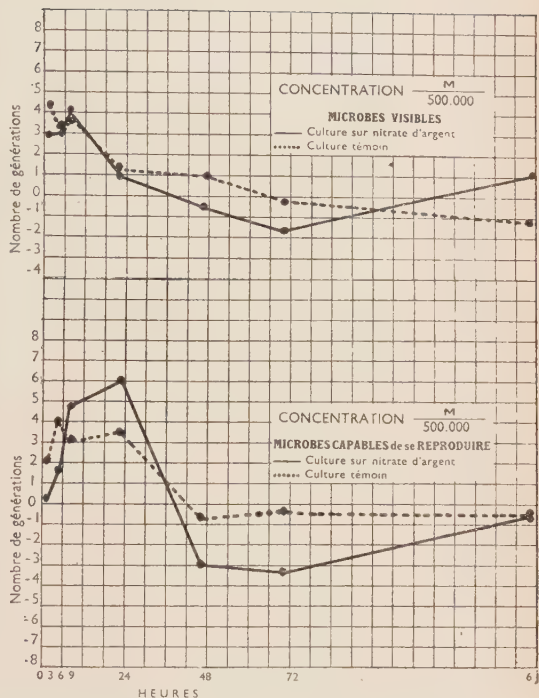
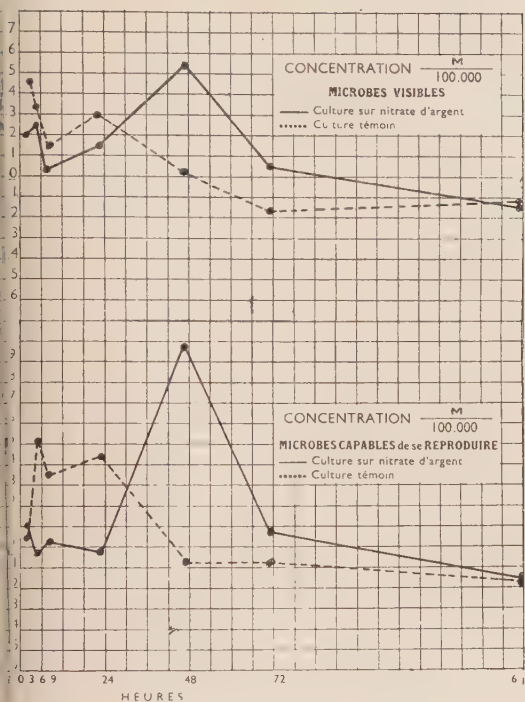
de Microbes en fonction du temps
de la multiplication)



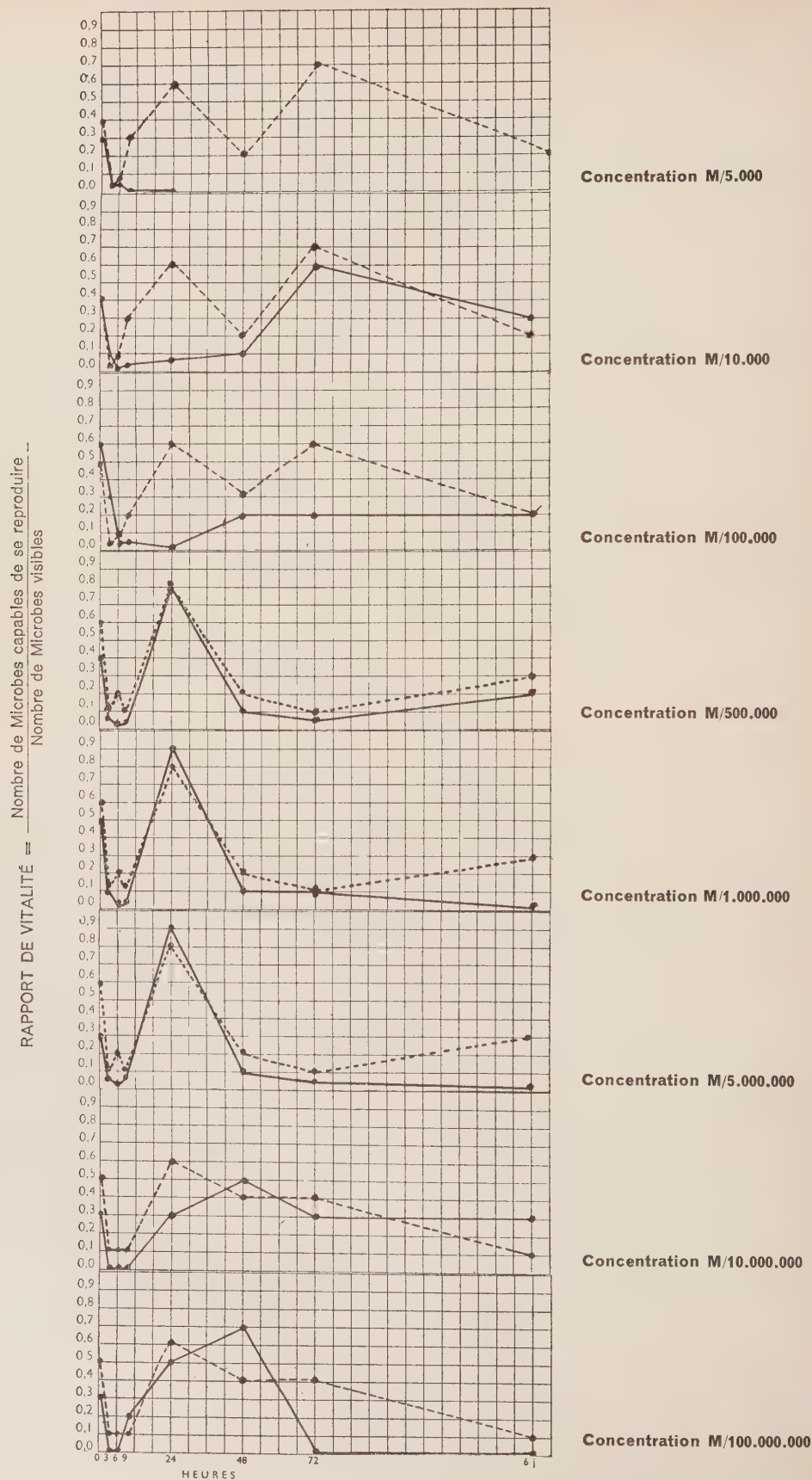
Courbes des nombres de Générations



en fonction du temps



Courbes des Rapports de Vitalité en fonction du temps



DISCUSSION DES RÉSULTATS OBTENUS

Avant d'examiner les résultats qui concernent chacun des sels étudiés, il est intéressant d'établir la comparaison des chiffres qui ont trait aux expériences témoins. Celle-ci, effectuée entre les nombres donnant la totalité des microbes visibles et ceux qui se rapportent aux microbes capables de se reproduire sur gélose, va nous permettre de voir si nos résultats sont conformes à ceux trouvés par les auteurs ayant déjà étudié la multiplication microbienne. En même temps, cette comparaison pourra nous renseigner sur la valeur des méthodes de numération utilisées. Cela fait, nous discuterons les valeurs trouvées pour chaque sel métallique étudié, en indiquant en même temps nos observations qui concernent les modifications de la morphologie, de la conservation des souches et de la pigmentation, provoquées par la présence de ces substances.

1^o Comparaison des résultats obtenus avec les cultures-témoins.

Comme à HEHEWERTH, WILSON, J. REGNIER, S. LAMBIN, R. DAVID, A. KAPLAN, la méthode des ensemencements sur plaques de gélose nous a toujours fourni des chiffres inférieurs à ceux fournis par la méthode de numération microscopique indirecte. Cela nous semble d'ailleurs tout à fait logique, parce que, dans une culture donnée, toutes les bactéries ne sont pas susceptibles de pouvoir se reproduire après transplantation sur un milieu différent de leur milieu originel. La méthode microscopique indirecte, dénombrant tous les microbes visibles de la culture, évalue non seulement ces germes dits « vigoureux » et capables de se reproduire sur un autre milieu, mais aussi des bacilles plus fragiles, incapables de subir un changement de milieu, quoique pouvant encore se multiplier dans les milieux liquides où ils ont pris naissance, ainsi que les microbes « morts » en suspension dans le liquide et encore colorables, jusqu'à ce que leur lyse se produise.

Comme R. DAVID, nous n'avons pu trouver aucune proportion constante entre les nombres de microbes fournis par ces deux techniques de numération. Ce rapport présente, en effet, de grandes variations, malgré les conditions de similitude dans

lesquelles sont prélevées les bactéries. C'est ainsi que pour l'heure 0, nous trouvons des valeurs allant de 0,3 à 0,8; tout au plus pouvons-nous dire que la valeur 0,5 est la plus fréquemment retrouvée. Ainsi, dans des conditions bien déterminées, on ne peut donc pas déduire de façon certaine la quantité de microbes capables de se reproduire sur milieu gélosé, d'après le nombre total de microbes visibles dénombrés. Ce manque de rapport montre à quel point les bactéries peuvent modifier leur vitalité et combien celle-ci dépend de nombreux facteurs.

Ces propriétés très variables sont très importantes à connaître dans la pratique, tant au point de vue de la conservation des souches que pour la préparation des toxines, des vaccins, des sérums et l'essai des antiseptiques.

Nos courbes traduisant la multiplication microbienne que nous avons obtenue (aussi bien pour les bacilles visibles que pour les bacilles capables de se reproduire sur gélose), présentent le même aspect général que celles trouvées par les auteurs indiqués ci-dessus. Nous pouvons y voir que pour les microbes visibles, la multiplication commence dès l'ensemencement, alors que pour les bacilles capables de se multiplier sur gélose, il existe très nettement une phase de latence, période qui se prolonge 2 ou 3 heures et pendant laquelle le nombre des germes n'augmente pas sensiblement. Il y succède une phase de croissance très intense, ayant une durée de 3 à 6 heures : c'est la phase de multiplication logarithmique, pendant laquelle les temps de génération sont très petits. Le nombre maximum de germes étant atteint, la décroissance survient, moins rapide que la croissance : les temps de génération augmentent jusqu'à devenir infiniment grands.

En ne considérant que les microbes visibles, nous n'avons jamais observé de phase de latence : la phase logarithmique commence aussitôt, dès l'ensemencement. Il est très important de pouvoir affirmer que la phase de latence ne s'observe qu'avec l'emploi de la méthode de numération des colonies développées sur plaques de gélose. Son existence tient uniquement à une transplantation qui ne convient pas à un certain nombre de germes : *Pratiquement il n'y a pas de phase de latence.*

Ces résultats confirment les expériences de J. REGNIER et S. LAMBIN (1927). De ce fait, toutes les hypothèses émises pour expliquer l'existence de la phase de latence perdent leur raison

d'être. La multiplication bactérienne commence dès l'ensemencement, les microbes se divisent tout de suite très rapidement et ne donnent alors naissance qu'à des sujets peu vigoureux, incapables de subir un repiquage sur milieu solide, mais pouvant continuer à se reproduire dans le milieu liquide où ils sont nés. C'est pour cette raison que de nombreux auteurs, n'ayant employé que la technique de numération des colonies capables de se développer sur milieu solide, ont été intrigués par l'existence de cette période de multiplication ralentie et ont cherché à l'expliquer par de multiples hypothèses.

Voilà donc un exemple, où l'emploi conjugué de deux méthodes de numération microbienne a permis d'élucider un phénomène jusqu'alors inexplicable.

Le nombre maximum a toujours été atteint à la 24^e heure pour les microbes capables de se reproduire, et à la 48^e heure pour les microbes visibles. Les chiffres maximum atteints ont toujours été inférieurs à ceux trouvés par A. KAPLAN et R. DAVID. Le nombre de microbes visibles a rarement dépassé 9 milliards (6 milliards en moyenne) et le nombre de microbes capables de se reproduire a rarement excédé 3 milliards. Ceci est fort compréhensible, étant donné que notre culture-témoin a toujours été faite sur une *solution de peptone dialysée pendant 15 jours*. J. MORSCHOINE, dans son étude sur la valeur bactériologique des peptones, a trouvé également, pour des peptones pepsiques semblables à la nôtre, des valeurs moyennes de 6 milliards pour les microbes visibles et de 3 milliards pour les microbes capables de se reproduire sur gélose.

Si nous considérons les chiffres maximum obtenus pour les bacilles capables de se multiplier sur gélose, nous voyons qu'ils sont assez voisins les uns des autres, à une ou deux exceptions près. Les chiffres maximum obtenus pour les bacilles visibles sont, par contre, beaucoup moins réguliers. Nous confirmons ainsi les résultats de R. DAVID.

De plus, cette dernière méthode, déjà pénible pendant les premières heures de la poussée, devient de plus en plus difficile au fur et à mesure du vieillissement de la culture. A ce stade, en effet, certains bacilles prennent des formes variables (coco-bacilles et même cocci, formes longues), d'autres se colorent mal, des précipités du bouillon se trouvent en même temps fixés et colorés sur les préparations et donnent lieu à des confu-

sions. A notre avis, l'emploi de cette méthode ne devrait se borner qu'à l'étude de cultures âgées de 3 jours à 6 jours au maximum.

D'une façon générale, il y a une grande régularité dans l'allure de nos courbes-témoins; elles sont pratiquement identiques.

Les deux méthodes ont donc une réelle valeur et, bien que la méthode de numération par ensemencement sur gélose semble donner des résultats plus réguliers, la méthode microscopique comparative peut être très utilement employée, en même temps que l'autre méthode. N'est-ce pas, en effet, l'emploi de cette méthode comparative qui a permis à J. REGNIER et à S. LAMBIN de constater qu'il n'y avait pas de phase de latence?

Enfin, il peut être très intéressant de voir tous les microbes que l'on dénombre et de suivre leurs modifications morphologiques.

2^o *Comparaison des résultats concernant l'influence de certains sels métalliques sur la multiplication microbienne.*

A. — NITRATE DE LANTHANE

Dans la poussée microbienne, nous avons vu que l'on pouvait distinguer trois parties principales : phase de latence (seulement pour les microbes capables de se reproduire), phase de multiplication rapide ou logarithmique, et phase de multiplication ralentie. Pour chaque concentration nous avons indiqué la durée de chacune de ces périodes et les temps de génération correspondants. Nous avons indiqué également le maximum de microbes visibles et le maximum de microbes « vivants », ainsi que les heures où ces maximum sont atteints. Chaque concentration est toujours comparée avec le témoin correspondant.

1^o *Influence du nitrate de lanthane à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique.*

a) *Existence de doses excitantes, indifférentes et toxiques.*

De l'examen des tableaux et des courbes, ressort nettement l'existence d'une accélération de la multiplication microbienne, pour de faibles concentrations du sel de lanthane étudié. Il

existe donc bien des doses favorisantes, comme il existe des doses indifférentes, pour lesquelles la poussée est sensiblement la même que pour le témoin, ainsi que des doses défavorables et inhibitrices. L'action favorisante est surtout marquée pour les microbes capables de se reproduire. A une concentration de M/30.000, le maximum de ces microbes est de 5 milliards, alors qu'il est de 2 milliards pour le témoin. Pour les microbes visibles, le nombre maximum de microbes atteint est pratiquement identique : 8 milliards de germes par cm^3 , mais ce chiffre est déjà atteint avec 24 heures d'avance par la culture contenant du lanthane. A ce propos, remarquons que les cultures avec lanthane atteignent toutes leur chiffre maximum à 24 heures, alors qu'il est atteint régulièrement à 48 heures pour les témoins. En ce qui concerne les heures intermédiaires et antérieures à 24 heures, l'influence du lanthane se manifeste très nettement par la production d'un nombre bien plus considérable de germes, en particulier à la neuvième heure, fin de la période logarithmique. Pour les doses indifférentes ou même légèrement défavorables, il est intéressant de noter qu'aux heures 3 et 6, les cultures sur lanthane ont toujours un nombre de microbes supérieur à celui des cultures-témoins. Lorsqu'il s'agit de doses défavorables, les germes visibles se multiplient légèrement, pour décroître ensuite rapidement; leur multiplication donne vraisemblablement naissance à un nombre croissant de germes très fragiles et, par cela même, incapables de supporter un changement de milieu; il en résulte que le nombre de microbes capables de se reproduire va continuellement en diminuant : en effet, la courbe décroît depuis l'origine.

b) *Allure de la courbe de croissance.*

Malgré la présence du sel de lanthane, nous retrouvons les mêmes phases caractéristiques de poussée : phase de latence (seulement pour les microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose), phase logarithmique, phase de multiplication ralentie. Ces périodes sont plus ou moins modifiées selon le degré de concentration du sel de lanthane. Pour les microbes visibles, il n'y a pas de phase de latence, sauf aux deux plus fortes concentrations. Cela s'explique peut-être par l'action toxique du nitrate de lanthane à de telles doses et par la néces-

sité d'adaptation des bacilles les moins fragiles. En ce qui concerne les microbes capables de se reproduire, cette phase a été retrouvée à toutes les concentrations avec une durée de 3 heures; elle s'est même trouvée portée à 6 heures pour les fortes concentrations.

La phase logarithmique existe également, aussi bien pour les microbes visibles que pour les microbes capables de se reproduire : elle dure jusqu'à la neuvième heure. Cette phase est naturellement inexistante lorsque les doses de lanthane sont défavorables à la multiplication.

Quant à la phase de multiplication ralentie, en ce qui concerne les microbes visibles, elle est très raccourcie pour les cultures sur lanthane; nous avons déjà, en effet, remarqué que le nombre maximum de germes visibles est atteint à 24 heures, alors que le témoin n'atteint cette valeur qu'à 48 heures. Le nombre maximum de germes capables de se reproduire est atteint à 24 heures (avec ou sans lanthane).

Pendant la phase logarithmique, le temps de génération minimum des microbes visibles est nettement diminué à la dose favorisante M/30.000 : il est, en effet, de 31' (celui du témoin est de 40'); il en est de même pour les microbes capables de se reproduire : 34' au lieu de 45'. De même, cette dose favorisante de nitrate de lanthane diminue d'une façon appréciable le temps de génération pendant la phase de latence (microbes capables de se reproduire) : il est de 94' alors que le témoin atteint 105'.

2^o *Influence du nitrate de lanthane à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique.*

a) *Rapport de vitalité.*

Comme nous l'avons déjà dit, c'est le rapport du nombre de microbes capables de se reproduire sur gélose au nombre de microbes visibles. Ce rapport varie constamment au cours de la poussée.

Nous donnons sous forme de tableau les valeurs de ce rapport de vitalité au moment des différents prélèvements.

VALEUR DES RAPPORTS DE VITALITÉ CONCERNANT CES CULTURES
AVEC LANTHANE (L) OU SANS LANTHANE (T) A DIFFÉRENTS
MOMENTS DE LA MULTIPLICATION MICROBIENNE.

Heures des prélèvements	CONCENTRATIONS DE NITRATE DE LANTHANE EXPÉRIMENTÉES											
	M/500		M/1.000		M/3.000		M/4.500		M/6.000		M/30.000	
	L	T	L	T	L	T	L	T	L	T	L	T
0	0,3	0,6	0,6	0,5	0,8	0,7	0,6	0,5	0,6	0,5	0,7	0,6
3	0,01	0,08	0,05	0,08	0,1	0,06	0,01	0,02	0,01	0,1	0,04	0,08
6	0,00007	0,06	0,08	0,07	0,1	0,1	0,04	0,04	0,03	0,1	0,1	0,06
9	0,000002	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
24		0,4	0,001	0,2	0,06	0,4	0,4	0,4	0,6	0,4	0,6	0,4
48		0,2		0,2	0,3	0,2	0,4	0,1	0,3	0,1	0,2	0,2
72		0,1		0,1	0,02	0,2	0,1	0,1	0,4	0,1	0,3	0,1
6 jours		0,1		0,1	0,01	0,1	0,06	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1

Ce rapport diminue en général au cours des 3 premières heures, ce qui est normal, étant donnée l'existence de la phase de latence seulement pour les microbes capables de se reproduire. Ce rapport croît ensuite et devient maximum à 24 heures, aussi bien pour les cultures sur lanthane que pour les cultures-témoins. Il diminue ensuite, lentement pour le témoin et plus rapidement pour les doses défavorables que pour les doses excitantes. Pour des concentrations très défavorables, ce rapport ne fait que décroître (M/500), ou n'atteint qu'une valeur maximum plus faible (M/1.000). Signalons encore qu'aux doses les plus favorables (M/6.000 et M/30.000), ce maximum est supérieur au témoin.

b) *Conservation :*

Nous avons conservé nos cultures aussi longtemps que possible, en faisant tous les mois un repiquage sur gélose, afin de voir combien de temps ces cultures conservent des germes assez vigoureux pour se reproduire sur des milieux solidifiés.

Voici les temps au bout desquels les ensemencements sur gélose des bouillons sur lanthane et de leurs témoins donnent, pour la dernière fois, une culture au bout de 24 h.

CONCENTRATIONS	M/500	M/1.000	M/3.000	M/4.500	M/6.000 (1)	M/30.000
Cultures sur lanthane.	72 heures	10 jours	10 mois	12 mois	6 mois	8 mois
Témoin	4 mois	4 mois	5 mois	4 mois	4 mois	4 mois

Remarquons que ce ne sont pas les doses les plus excitantes qui donnent aux cultures la conservation la plus longue.

Nous obtenons, en effet, une conservation plus longue pour des doses plutôt indifférentes (M/3.000 et M/4.500). Cela confirmerait certains résultats trouvés par R. DAVID. Cet auteur a remarqué, en effet, que certains milieux, dans lesquels la multiplication est très rapide, ne permettent pas une longue conservation de la vitalité des germes, tandis que d'autres milieux, dans lesquels la poussée n'est pas aussi brillante, permettent aux microbes une vitalité et une conservation plus prolongée.

Ajoutons encore que, dans tous les cas, exception faite des doses nettement défavorables, la conservation des cultures sur lanthane a été toujours plus longue que la conservation des témoins correspondants.

3^o *Influence du nitrate de lanthane à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique.*

a) *Morphologie :*

La méthode de numération comparative de WRIGHT-FRIES permet d'observer les modifications qui se produisent dans la forme des bactéries au cours de leur multiplication. Ces modifications ont été vues pour la première fois par P.-F. CLARK et W.-H. RUEHL, puis par HENRICI et ont été très nettement retrouvés par J. REGNIER et A. KAPLAN. Procédant à la mensuration du bacille pyocyanique, ces derniers auteurs ont obtenu

(1) La conservation aurait peut être été plus longue si l'expérience n'avait été arrêtée par l'évaporation du bouillon de culture.

les chiffres suivants : au moment de l'ensemencement, les bacilles mesurent en moyenne $1\ \mu$ à $2\ \mu$. Après 2 heures, 4 heures, 6 heures, 8 heures de culture, ces bacilles atteignent des longueurs moyennes de : $2\ \mu$ à $3\ \mu$; $2\ \mu,5$ à $3\ \mu,5$; $3\ \mu$ à $4\ \mu$; $3\ \mu,5$ à $4\ \mu$. Cette longueur diminue dans les heures qui suivent : au bout de 24 heures, elle est de $2\ \mu$ à $3\ \mu$; au bout de 36 heures, de $2\ \mu$ à $2\ \mu,5$ et elle atteint seulement $2\ \mu$ à 48 heures.

Il se produit donc un allongement des bacilles dès le début de la période logarithmique. Cet allongement subsiste un certain temps et cesse lorsque la multiplication ralentit. Nous avons comparé des préparations de bacilles pyocyaniques ayant poussé soit sur du bouillon à l'extrait de viande Liebig, soit sur notre milieu-témoin (eau peptonée dialysée pendant 15 jours) et nous avons trouvé que ces derniers sont de la même longueur moyenne et ont le même aspect que les bacilles qui ont poussé sur le bouillon à l'extrait de viande.

En ce qui concerne les cultures sur lanthane, nous avons observé différentes variations dans la morphologie, selon le degré de concentration de ce sel. Aux concentrations M/500 et M/1.000, les bacilles sont très courts et très fins, ils prennent mal le colorant. A M/3.000, ils sont un peu plus gros, mais cependant encore plus fins que les bacilles-témoins. Aux concentrations les plus favorables (M/6.000 et M/30.000), ces microbes sont nettement plus épais et bien plus longs que les bacilles-témoins. Ils fixent très énergiquement la matière colorante employée. Ils semblent atteindre leur maximum de grandeur entre 6 et 9 heures.

b) *Pigmentation* :

Nous avons également observé des variations dans l'intensité de la pigmentation selon la plus ou moins grande concentration en sel de lanthane. Les cultures-témoins se pigmentent régulièrement vers la 72^e heure et parfois même seulement le 4^e jour. Les concentrations les plus fortes (M/500, M/1.000), donc défavorables, n'ont *jamais* présenté la moindre pigmentation. Ce sont les concentrations indifférentes M/3.000 et M/4.500 qui ont présenté la pigmentation la plus accentuée. Celle-ci est nettement plus intense que la pigmentation-témoin; elle apparaît déjà au bout de 24 heures et même vers la 9^e heure

pour M/3.000. Les concentrations M/6.000 et M/30.000 présentent également une très belle coloration verte, plus intense que le témoin, mais cependant moins vive que dans les deux concentrations précédentes. De plus, le pigment tend à apparaître au même moment que celui du témoin : vers la 48^e heure et la 72^e heure.

De même que pour la durée de conservation, nous remarquons que ce ne sont pas pour des concentrations provoquant une forte multiplication, que le pigment est le plus intense ou apparaît le plus rapidement, mais plutôt pour des concentrations peu exaltantes. Cela ne serait-il pas le reflet d'une manifestation de défense, préliminaire d'une accoutumance vis-à-vis de certains sels métalliques, employés à des doses peu favorables mais non mortelles?

B. — NITRATE DE CÉRIUM

1^o *Influence du nitrate de cerium à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique.*

a) *Existence de doses excitantes, indifférentes et toxiques :*

L'examen des tableaux et des courbes nous montre tout de suite que le nitrate de cérium peut être très favorisant ; il peut provoquer une intense et rapide multiplication lorsqu'il est employé à des doses suffisamment faibles. A côté de celles-ci, il existe des concentrations indifférentes qui permettent une multiplication semblable à celle du témoin et des concentrations plus fortes qui empêchent toute poussée microbienne. Cette excitation de la multiplication se manifeste aussi bien pour les microbes visibles que pour les microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose. A la concentration de M/100.000 les microbes visibles atteignent une valeur supérieure à 10 milliards, avec un témoin de 8 milliards ; le nombre de microbes capables de se reproduire sur gélose dépasse 8 milliards, avec un témoin de 5 milliards. Ces chiffres maximum sont atteints à 24 heures dans les deux cas. L'accélération de la poussée des microbes capables de se reproduire est également très nette pendant les premières heures, non seulement pour les doses excitantes, mais aussi pour les doses indifférentes. Le nombre de

germes atteint à la fin de la période de latence et de la phase logarithmique est plus élevé que celui obtenu au terme des phases correspondantes de la culture-témoin. Dans le cas de doses plutôt indifférentes ($M/10.000$ et $M/20.000$), il se produit donc une sorte de coup de fouet peu durable. Cette stimulation passagère est moins accentuée pour les microbes visibles, quoiqu'il y ait tout de même aux heures 3 et 6 une quantité de germes supérieure à celle du témoin. Les concentrations $M/1.000$, $M/2.000$ et même $M/4.000$ sont toxiques; elles donnent une brève et légère multiplication des microbes visibles, suivie d'une décroissance rapide, alors que le nombre de microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose diminue dès l'ensemencement (nous en avons esquissé la raison au sujet du nitrate de lanthane).

b) *Allure de la courbe de croissance:*

Comme pour les témoins et les cultures sur lanthane, on retrouve sur la courbe de multiplication toutes les phases classiques, c'est-à-dire : la phase de latence, la phase logarithmique, la phase de multiplication ralentie. La durée de ces périodes peut subir parfois certaines modifications selon la concentration employée du sel de cérium.

Ici encore on ne remarque pas de phase de latence pour les microbes visibles et on la retrouve à toutes les concentrations pour les microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose : elle a une durée de 3 heures, qui atteint même 6 heures à la concentration $M/4.000$.

On retrouve également la phase logarithmique pour les deux catégories de microbes, sauf aux concentrations inhibitrices, bien que pour $M/2.000$ la faible multiplication s'effectue logarithmiquement, pour décroître dès la 9^e heure. Cependant cette période ne semble avoir qu'une durée de 6 heures pour les concentrations les plus favorables (microbes visibles).

La phase de multiplication ralentie se produit de la 9^e à la 24^e heure, — heure à laquelle le nombre maximum de microbes est atteint, — et ceci se manifeste pour les deux sortes de microbes.

La différence entre les temps de génération minima est moins marquée que celle des cultures sur lanthane. Nos tableaux

montrent que le temps de génération minimum concernant les microbes capables de se reproduire s'abaisse à 28' pour la concentration la plus favorable, c'est-à-dire : M/100.000 (le témoin correspondant atteint 41').

2° *Influence du nitrate de cerium à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique.*

a) *Rapport de vitalité:*

Voici les valeurs de ce rapport aux époques des différents prélèvements, résumées dans le tableau ci-dessous. (Ce = cultures sur cérium, T = cultures-témoins).

HEURE DES PRÉLÈ- VEMENTS		CONCENTRATIONS DE NITRATE DE CÉRIUM EXPÉRIMENTÉES												
		M/1.000	M/2.000		M/4.000		M/10.000		M/20.000		M/40.000		M/100.000	
			Ce	T	Ce	T	Ce	T	Ce	T	Ce	T	Ce	T
0	Toxique	0,2	0,3	0,3	0,4	0,5	0,3	0,5	0,3	0,5	0,4	0,6	0,4	
3		0,002	0,2	0,07	0,06	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,06	0,1	0,06	
6		0,007	0,1	0,01	0,1	0,1	0,06	0,1	0,06	0,04	0,1	0,6	0,1	
9		0,02	0,08	0,02	0,1	0,4	0,1	0,5	0,1	0,1	0,1	0,3	0,1	
24		0	0,04	0,01	0,8	0,5	0,4	0,6	0,4	0,7	0,6	0,7	0,6	
48			0,06	0,2	0,4	0,4	0,4	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	0,6	
72			0,1	0,5	0,2	0,4	0,4	0,1	0,4	0,1	0,3	0,2	0,3	
6 jours			0,2	0,4		0,3	0,06	0,1	0,06	0,1	0,06	0,4	0,06	

Nous remarquons ici, comme pour le lanthane, une diminution du rapport de vitalité au cours des 3 premières heures, puis une augmentation jusqu'à un maximum qui est atteint en général à 24 heures. Ce rapport diminue ensuite, mais moins rapidement pour les cultures sur cérium que pour les témoins. Le chiffre maximum obtenu est supérieur au témoin pour les deux concentrations les plus favorables : cela signifie que le nombre de microbes capables de se reproduire sur gélose se

rapproche beaucoup de celui des microbes visibles. A de telles doses, le cérium augmenterait donc la vitalité des germes et leur permettrait de mieux supporter un changement de milieu.

Ajoutons encore que pour des doses qui ne sont pas particulièrement favorables, telles M/4.000 et M/10.000, ce rapport ne diminue que très lentement et se maintient sensiblement élevé au bout de 6 jours. On pourrait faire à ce sujet la même remarque que pour le lanthane : la présence de certaines doses de nitrate de cérium (mais des doses non mortelles ou pas trop défavorables) augmente la résistance des germes et leur permet de s'accoutumer à leur milieu peu favorable.

b) *Conservation :*

Comme pour le lanthane, nous indiquons pour chaque concentration les temps pour lesquels les cultures donnent pour la dernière fois des repiquages positifs sur gélose.

CONCENTRATIONS	M/1.000	M/2.000	M/4.000	M/10.000	M/20.000	M/40.000	M/100.000
Cultures sur cérium	48 heures	10 jours	12 mois	16 mois	5 mois	16 mois	16 mois
Témoin	5 mois	5 mois	5 mois	5 mois	5 mois	4 mois	4 mois

Nous retrouvons encore ici que les cultures présentant les poussées les plus vigoureuses ne sont pas seules à avoir les temps de conservation les plus longs. Ainsi des doses indifférentes (M/10.000) et même plutôt défavorables de cérium (M/4.000) accusent un temps de conservation aussi important que les concentrations les plus favorables. Nous venons de voir également que pour ces deux concentrations M/4.000 et M/10.000, il existe des rapports de vitalité qui décroissent très lentement. Ces phénomènes viennent donc encore à l'appui des observations de R. DAVID et de nos propres observations sur le lanthane, à savoir : que les milieux qui provoquent la multiplication la plus rapide ne sont pas toujours ceux qui assurent la conservation la plus longue des germes. Donc, comme pour le lanthane, l'addition de cérium au milieu de culture provoque bien une

augmentation de la vitalité et de la conservation des bacilles pyocyaniques. A une exception près, et mises à part les cultures contenant des doses toxiques, les témoins présentent une durée de conservation beaucoup plus courte que les cultures sur cérium.

3^o *Influence du nitrate de cerium à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique.*

a) *Morphologie :*

Nous avons également remarqué quelques variations dans la morphologie des bacilles en expérience. La grandeur de la concentration du nitrate de cérium semble intervenir dans ces modifications. Nous avons, en effet, observé que, pour des doses toxiques et très peu favorables (M/1.000, M/2.000, M/4.000), les bacilles restent très courts, bien plus courts que les bacilles-témoins et ceci, aussi bien pendant les premières heures de poussée que vers la 24^e heure. Aux concentrations M/10.000 et M/20.000, les bacilles deviennent plus gros, plus épais et prennent plus énergiquement le colorant. Ils atteignent leur grandeur maximum, laquelle est supérieure à celle des témoins, aux concentrations les plus favorables (M/40.000 et M/100.000). La beauté morphologique des microbes semble donc en relation directe avec la concentration la plus favorable à la multiplication. La taille maximum semble être atteinte entre la 6^e et la 9^e heure pour les concentrations optima.

b) *Pigmentation :*

Nos cultures-témoins se sont régulièrement pigmentées vers le 4^e jour. Pour les doses toxiques et défavorables (M/500, M/1.000 et M/2.000), nous n'avons jamais observé la production de pigment. Aux concentrations M/4.000 et M/10.000, nous avons noté une pigmentation très accentuée, surtout pour M/10.000 : cette pigmentation était bien supérieure à celle de la culture-témoin correspondante. A M/4.000, ce pigment apparaît même à la 48^e heure ; il se produit vers le 3^e jour à la concentration M/10.000. Par contre, M/20.000 n'a donné qu'une faible colo-

ration qui apparaît vers le 4^e jour. Quant aux cultures qui contiennent du nitrate de cérium aux concentrations M/40.000 et M/100.000, elles prennent une pigmentation très accentuée, supérieure au témoin, mais tout au plus égale en intensité aux pigmentations obtenues aux concentrations : M/4.000 et M/10.000; elle n'apparaît d'ailleurs qu'au 10^e jour. Ici encore, nous voyons cette manifestation vitale du microbe, la pigmentation, apparaître le plus intensément et le plus rapidement à des doses (M/4.000 et M/10.000) pour lesquelles la multiplication n'est pas la plus intense, mais pour lesquelles la vitalité est la plus grande et la conservation la plus longue.

C. — NITRATE DE PLOMB

1^o *Influence du nitrate de plomb à différentes concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique.*

a) *Existence de doses excitantes, indifférentes et toxiques:*

Nous avons pu mettre également en évidence, pour ce métal, l'existence de doses qui excitent la multiplication du bacille pyocyanique. L'examen des tableaux et des courbes rend compte de ce phénomène aussi bien pour les microbes visibles que pour les microbes capables de se reproduire sur gélose.

Nous voyons ainsi que les actions excitantes commencent à se manifester à M/50.000, se poursuivent à M/100.000, M/1.000.000 et se manifestent encore faiblement à M/10.000.000.

A la concentration M/50.000, le nombre maximum de germes visibles obtenu est supérieur à 5 milliards, alors que le témoin est inférieur à 4 milliards; le nombre de microbes capables de se reproduire est supérieur à 3 milliards avec un témoin d'environ 2 milliards.

A la concentration M/100.000, le nombre maximum des germes visibles est supérieur à 5 milliards et demi; le témoin en atteignant à peine 3 milliards et demi; le chiffre maximum de germes capables de se reproduire est de 3 milliards, alors que le témoin atteint 2.500.000.000 de germes.

A la concentration M/1.000.000, le maximum de germes visibles atteint près de 7 milliards pour un témoin légèrement supérieur à 3 milliards, et le maximum de germes capables de se reproduire atteint 3 milliards et demi pour un témoin de 2 milliards et demi.

Par contre, la dilution la plus faible ($M/10.000.000$) ne s'est pas révélée comme étant particulièrement favorable. Elle est même à considérer comme indifférente en ce qui concerne les microbes visibles, alors qu'elle présente une influence nettement excitante en ce qui concerne les microbes capables de se reproduire, — influence surtout marquée pendant les premières heures de la poussée. Les chiffres maximum de microbes visibles sont atteints en général à 24 heures, alors que ceux des témoins ne le sont qu'à 48 heures. Une exception cependant, pour la concentration $M/50.000$, qui atteint son maximum à 48 heures. Les microbes capables de se reproduire cultivés avec ou sans plomb, atteignent ensemble leur nombre maximum à 24 heures, — exception faite naturellement des doses défavorables où la poussée est bien plus lente et beaucoup plus faible. Les concentrations $M/500$ et $M/1.000$ sont franchement toxiques, les cultures ne présentent aucun développement et les microbesensemencés meurent rapidement.

Les concentrations $M/2.000$ et $M/5.000$, tout en étant moins toxiques, ne provoquent qu'une légère multiplication des microbes visibles qui est très inférieure au témoin; les microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose commencent à se multiplier beaucoup plus tardivement, après avoir subi une forte diminution de leur nombre, dès l'ensemencement. Ceci est particulièrement net à la concentration $M/2.000$. Cette diminution du nombre de germes qui précède une multiplication plus intense semble montrer que de nombreux microbes, nés au sein d'un milieu peu favorable, sont fragiles et ne supportent pas un changement de milieu. Ils ont besoin d'un certain temps d'adaptation, qui les rend plus vigoureux; c'est alors que la multiplication des germes capables de se développer sur un autre milieu commence à se manifester. Il est également possible que ces germes fragiles, bien que pouvant vivre dans le milieu où ils ont pris naissance, meurent peu à peu et que ce soit seulement à partir d'une sélection des germes les plus résistants que les mieux adaptés que se manifeste la prolifération ultérieure.

b) *Allure de la courbe de croissance:*

Comme pour le lanthane et le cérium, nous retrouvons la présence des mêmes phases composant la courbe de poussée.

La phase de latence n'apparaît encore ici que dans le cas des microbes capables de se reproduire sur gélose; elle a une durée de 3 heures; à la concentration $M/2.000$, elle atteint 9 heures.

La phase logarithmique semble moins importante que dans les cas étudiés jusqu'à présent. En ce qui concerne les microbes visibles, elle ne semble subsister qu'aux dilutions $M/100.000$, $M/1.000.000$ et $M/10.000.000$ (sa durée atteignant de 6 à 9 heures). Elle prend un aspect assez particulier pour $M/5.000$, $M/10.000$, $M/50.000$: en effet le temps de génération est petit de 0 à 3 heures, il s'allonge notablement de 3 à 6 heures pour reprendre une valeur plus petite de 6 à 9 heures. Elle est bien plus nette et régulière pour les microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose.

La phase de multiplication ralentie se prolonge en général jusqu'à 24 heures lorsque les concentrations sont les plus favorables (pour les deux sortes de microbes), alors qu'elle peut durer jusqu'à 48 heures et même 72 heures lorsque les concentrations sont moins favorables.

Le temps de génération minimum des microbes visibles est de 30 minutes, pour la concentration $M/1.000.000$. Celui des microbes capables de se reproduire est de 37 minutes, mais pour une concentration en sel de plomb plus forte : $M/50.000$. A ce propos, il est intéressant de remarquer que les temps de génération minimum ne sont pas obtenus à la même concentration pour les deux espèces de microbes envisagées.

2° *Influence du nitrate de plomb à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique.*

a) *Rapport de vitalité:*

Nous indiquons sous forme de tableau les valeurs de ce rapport au moment des différents prélèvements (Pb = cultures sur plomb et T = cultures-témoins).

Nous voyons que ce rapport subit à peu près les mêmes variations que celles déjà observées pour le lanthane et le cérium. Le maximum est atteint en général à 24 heures pour les dilutions favorables, et plus tardivement dans le cas des

concentrations toxiques. Remarquons également que lorsqu'il s'agit de concentrations inhibitrices ou peu favorables (M/2.000, M/5.000, M/10.000), ce rapport diminue très lentement et se maintient sensiblement élevé au 6^e jour.

HEURES DES PRÉLÈ- VEMENTS	CONCENTRATIONS DE NITRATE DE PLOMB EXPÉRIMENTÉES														
	M 1.000	M 2.000		M 5.000		M 10.000		M 50.000		M 100.000		M 1.000.000		M 10000000	
	Toxique	Pb	T	Pb	T	Pb	T	Pb	T	Pb	T	Pb	T	Pb	T
0		0,4	0,6	0,4	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6	0,5	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6
3		0,03	0,08	0,05	0,09	0,06	0,08	0,01	0,08	0,04	0,09	0,04	0,09	0,1	0,08
6		0,003	0,04	0,04	0,04	0,3	0,1	0,2	0,04	0,08	0,2	0,1	0,2	0,2	0,1
9		0	0,4	0,02	0,02	0,5	0,2	0,1	0,4	0,1	0,4	0,4	0,4	0,3	0,2
24		0	0,9	0,01	0,8	0,04	0,6	0,8	0,9	0,4	0,7	0,5	0,7	0,7	0,6
48		0,1	0,5	0,06	0,6	0,5	0,2	0,3	0,5	0,2	0,2	0,5	0,2	0,4	0,2
72	0,2	0,2	0,3	0,4	0,7	0,5	0,1	0,2	0,4	0,1	0,2	0,1	0,2	0,5	
6 jours	0,2	0,2	0,4	0,9	0,3	0,1	0,1	0,2	0,3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,04	0,1

b) *Conservation :*

Nous donnons un tableau semblable à ceux donnés pour les métaux précédents. Toutefois, on observera que, nos expériences s'étant déjà poursuivies durant huit mois, nous n'avons pas cru devoir les prolonger jusqu'à la mort de toutes les cultures.

Concen- trations	M 500	M 1.000	M 2.000	M 5.000	M 10.000	M 50.000	M 100.000	M 1.000.000	M 10.000.000
Cultures sur plomb	0	6 heur	8 mois	8 mois	8 mois	8 mois	8 mois	5 mois	6 mois
			(repiquage encore positif)						
Témoin	5 mois	5 mois	6 mois	5 mois	8 mois	6 mois	8 mois	8 mois	8 mois
					(repiquage encore positif)				

De ces observations, on le voit, se dégage le même phénomène trouvé déjà pour le lanthane et le cérium; ce ne sont pas les concentrations favorisant le mieux la poussée microbienne qui assurent aux microbes la plus longue conservation. Des dilutions telles que M/1.000.000 et M/10.000.000 ne donnent plus de repiquages positifs au bout de 5 et 6 mois, alors que des concentrations plutôt défavorables comme M/2.000 ou peu favorables comme M/5.000 et M/10.000 assurent encore des repiquages positifs au bout de 8 mois. Ces phénomènes appuient à nouveau les considérations de R. DAVID ainsi que les résultats précédemment exposés et dont nous avons parlé à l'occasion du lanthane et du cérium.

3° *Influence du nitrate de plomb à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique.*

a) *Morphologie:*

Le degré de la concentration du sel de plomb semble avoir une action sur la morphologie des bacilles étudiés. Il est intéressant de signaler que les microbes sont aussi beaux, aussi épais, et prennent le colorant avec la même intensité, à des concentrations plutôt défavorables (telle M/2.000), qu'à des concentrations provoquant une exaltation marquée de la poussée bactérienne (telles M/100.000 et M/1.000.000). Nous avons toujours rencontré les plus beaux microbes entre la 6^e et la 9^e heure. Ce sont les concentrations indifférentes (telles M/5.000, M/10.000 et même M/50.000), qui semblent fournir les microbes les plus courts.

b) *Pigmentation:*

Les témoins se pigmentent vers le 3^e et le 4^e jour. Aux concentrations toxiques (M/500 et M/1.000), il n'est jamais apparu la moindre pigmentation. A M/2.000 et M/5.000, nous avons noté l'apparition tardive d'une légère fluorescence au 6^e jour. Aux concentrations M/10.000, M/50.000, M/10.000.000, cette légère fluorescence est apparue vers 48 heures. Enfin, la pigmentation la plus vive a été observée aux concentrations

M/100.000 et M/1.000.000, cette dernière ayant présenté la coloration la plus accentuée. Nous avons également noté que le pigment vert formé est d'un ton un peu différent de celui des pigments habituels du bacille pyocyanique : en effet, nous n'avons jamais retrouvé pour les cultures sur plomb la belle coloration vert-bleu que présentent les cultures-témoins; la pigmentation se rapproche plutôt d'un ton *vert-réséda*. Nous ne pouvons pas faire ici des remarques semblables à celles concernant les deux sels précédemment étudiés : en effet, dans les cultures sur plomb la vigueur de l'intensité du pigment se manifeste d'autant plus qu'il s'agit de concentrations plus favorisantes et plus exaltantes de la multiplication microbienne.

D. — NITRATE MERCURIQUE

1^o *Influence du nitrate mercurique à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique.*

a) *Existence de doses excitantes, indifférentes et toxiques :*

Ce sel métallique, bien que très antiseptique et très toxique, nous a montré, lui aussi, que lorsqu'il est employé à des concentrations suffisamment faibles, il agit de façon très appréciable comme stimulant de la multiplication du bacille pyocyanique. Cette conclusion se dégage nettement des tableaux et des courbes correspondant à ce corps. Mais, — phénomène très important à signaler, — cette exaltation ne s'est manifestée que pour les microbes visibles. Les nombres de microbes capables de se reproduire n'atteignent que des valeurs approchant plus ou moins les chiffres trouvés pour les témoins, et cela seulement dans le cas des concentrations les plus faibles.

Considérant les microbes visibles, nous voyons que déjà à M/50.000, il y a une exaltation très nette de la poussée : 5 milliards de germes, alors que le témoin n'atteint que 3 milliards et demi.

A la concentration M/100.000, il y a une action plus forte encore : près de 5 milliards et demi de bacilles, alors que le témoin s'élève à 3 milliards et demi. A notre étonnement, la concentration M/1.000.000 ne s'est pas montrée stimulante : les résultats sont semblables à ceux du témoin. Enfin, les concentrations

M/10.000.000 et M/100.000.000 se sont révélées également stimulantes; elles ont donné respectivement plus de 6 milliards et plus de 4 milliards et demi de germes, valeurs correspondant à des témoins qui atteignent dans les deux cas : 3 milliards et demi de germes. Remarquons encore que ces quantités maximum sont atteintes à 48 heures, à la différence des sels précédemment étudiés qui atteignent leur maximum déjà à 24 heures. Il est également intéressant de noter qu'à 24 heures, le nombre de microbes (et ceci pour les deux catégories de germes envisagés) est encore relativement faible et n'atteint jamais 400 *millions*, même pour les doses les plus favorables.

En ce qui concerne les microbes capables de se reproduire, nous avons toujours noté une diminution de leur nombre au cours des premières heures, puis la poussée se déclenche brusquement, donnant un nombre maximum de microbes qui tend tout au plus à égaler les valeurs des cultures-témoins. Le nombre des germes diminue en moyenne jusqu'à 24 heures; il devient parfois très petit (3.060 germes seulement par cm^3 à la concentration M/100.000). La poussée se produit alors brutalement; elle s'effectue très rapidement et dure moins longtemps que les poussées étudiées jusqu'à maintenant; le maximum est, en effet, déjà atteint à 48 heures. Cette poussée brusque, après une latence de 24 heures, vaut d'être soulignée, car nous l'avons régulièrement observée et seulement avec les cultures sur mercure. Dans les autres cas étudiés : témoins, cultures sur lanthane et sur cérium, les nombres maximum de microbes capables de se reproduire ont toujours été atteints à 24 heures (sauf aux concentrations toxiques). Cette diminution du nombre de germes capables de se reproduire, dès l'ensemencement, provient probablement de ce qu'il y a : soit une élimination de tous les germes fragiles, soit une incapacité de multiplication de ceux qui ont été affaiblis par le contact avec le nitrate mercurique, soit une trop grande fragilité des nouveaux germes qui, bien que provenant de la prolifération des germes les plus résistants, ne peuvent pas supporter une transplantation sur gélose. Il semble donc que, pendant les 24 heures qui succèdent à l'ensemencement, seuls les microbes les plus vigoureux peuvent supporter un changement de milieu. Puis ceux-ci, ainsi que ceux qui ont réussi à s'adapter au milieu mercurique, se multiplient : le nombre de microbes peuvent supporter un changement de milieu augmen-

tera donc. Signalons encore que les concentrations M/500 et M/1.000 sont franchement toxiques : les microbesensemencés sur de tels milieux meurent très rapidement. Les concentrations intermédiaires, telles que M/5.000 et M/10.000, permettent seulement un développement peu abondant et très lent des microbes visibles ; elles agissent défavorablement sur les microbes capables de se reproduire sur gélose.

b) *Allure des courbes de croissance :*

Les courbes de poussée des microbes visibles ont la même allure que celles qui correspondent aux sels métalliques dont nous venons de parler. Il n'y a pas de phase de latence, sauf aux deux plus fortes concentrations : M/5.000 et M/10.000, pour lesquelles cette phase est de 3 heures. En ce qui concerne les microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose, la courbe s'abaisse jusqu'à ce qu'elle atteigne un minimum, à partir duquel elle monte jusqu'à un maximum pour redescendre ensuite. La présence de ce minimum et de ce maximum semblent les caractéristiques des courbes de poussée des bacilles, se développant sur des milieux qui contiennent du nitrate mercurique.

Cette *inflexion* peut s'interpréter comme un allongement de la phase de latence. En adoptant cette dernière considération, le temps de latence atteint donc 48 heures à la concentration M/5.000, 24 heures aux concentrations M/10.000 et M/100.000, 9 heures aux concentrations M/50.000 et M/10.000.000, 6 heures à M/1.000.000 et 3 heures pour la concentration la plus faible (M/100.000.000).

Il est donc important de noter l'apparition d'une phase de latence dans le cas des microbes visibles (à des concentrations toxiques) et un allongement appréciable de celle-ci pour les microbes capables de se reproduire sur gélose. Cette anomalie provient-elle de ce qu'on a affaire à un métal très toxique ? Cela est fort probable.

Il en résulte, certes, que les autres phases sont un peu décalées ; mais ceci mis à part, elles présentent l'allure habituelle. Cependant, à la dilution M/5.000, le déclenchement de la poussée est si long (48 heures), qu'il n'y a plus de phase logarithmique proprement dite : la phase de multiplication ralentie succède à une longue phase de latence.

repiquages sur gélose effectués à partir des cultures conservées à l'étuve, ont donné des résultats positifs.

Il est intéressant de voir encore ici qu'une concentration plutôt défavorable (telle M/10.000) a gardé sa vitalité pendant 7 mois et que des germes ont pu vivre 2 mois dans un milieu contenant du nitrate mercurique à la concentration M/5.000. La plus longue conservation a été enregistrée pour la concentration M/1.000.000. Nous avons vu d'autre part que ce n'était pas la

Concentrations	M 500	M 1000	M 5000	M 10.000	M 50.000	M 100.000	M 1.000.000	M 10.000.000	M 100.000.000
Culture sur mercure	0	0	2 mois	7 mois	2 mois	10 mois	16 mois (vivait encore)	10 mois	10 mois
Témoin					14 mois	10 mois	14 mois		10 mois

concentration la plus favorable à la poussée du bacille pyocyannique. Nous pouvons donc répéter ici ce que nous avons dit à ce sujet pour les trois sels précédemment étudiés.

3^o *Influence du nitrate mercurique à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyannique.*

a) *Morphologie :*

Les variations apportées à la morphologie par la présence dans le milieu de culture, de nitrate mercurique ajouté à diverses concentrations, se traduisent par un raccourcissement extrême des bacilles étudiés. A toutes les concentrations envisagées, nous avons pu constater que les bacilles étaient très petits et plus courts que ceux provenant de cultures-témoins. Ils prennent même une forme cocobacillaire pour les doses les plus défavorables.

b) *Pigmentation :*

Le pigment est apparu chez les cultures-témoins régulièrement vers 48 heures et 72 heures. Les concentrations M/500, M/1.000, M/5.000 n'ont jamais présenté la moindre trace de pigmentation. A la concentration M/10.000, nous avons noté l'apparition, à 48 heures, d'une belle coloration verte, mais d'un ton différent de celui que secrète en général le bacille pyocyanique (la couleur observée se rapprocherait du vert-eucalyptus). Les cultures contenant des concentrations M/50.000, M/100.000, M/10.000.000, M/100.000.000 voient apparaître vers 48 heures ou 72 heures une fluorescence parfois peu marquée. A la concentration M/1.000.000, la couleur du pigment est encore bien différente des précédentes : c'est un vert qui tire très nettement sur le jaune; il apparaît également vers 48 heures.

Nous avons aussi remarqué que les pigments formés, même aux concentrations les moins toxiques, n'ont jamais accusé l'intensité atteinte pour les autres sels métalliques étudiés, et que celle-ci est uniforme, quelle que soit la concentration envisagée.

E. — NITRATE D'ARGENT

1^o *Influence du nitrate d'argent à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique.*

a) *Existence de doses indifférentes ou toxiques :*

Les résultats obtenus avec ce corps sont bien différents des résultats trouvés avec les sels métalliques précédents. En effet, nous n'avons pas retrouvé pour le nitrate d'argent les phénomènes d'exaltation que nous pensions observer, en faisant agir de faibles concentrations de ce sel. Le nombre maximum de microbes n'a jamais été supérieur aux chiffres correspondants des divers témoins. Ceux-ci ont tout au plus été approchés dans les concentrations les plus faibles. Nous n'avons donc relevé que des actions toxiques ou indifférentes.

Les concentrations M/500 et M/1.000 sont franchement toxiques; M/5.000 est aussi nettement défavorable, surtout en ce qui concerne les microbes capables de se reproduire. M/10.000

ne donne pas lieu à une poussée bien considérable des microbes visibles. A cette concentration, le nombre des microbes capables de se reproduire diminue d'abord très fortement, puis il subit une augmentation à laquelle succède à nouveau une légère diminution; une nouvelle poussée se déclenche qui permet aux germes d'atteindre très rapidement leur maximum (à 72 heures), puis le nombre de ceux-ci se remet à décroître. Rappelons à ce propos que W. ETTEL (dont nous avons parlé au début de cette II^e partie), avait observé une action analogue, c'est-à-dire une succession de paralysies et d'excitations de la poussée. Nous venons donc de mettre à notre tour ce phénomène en évidence, en employant des méthodes qui comportent des dénombrements à intervalles bien déterminés.

A la concentration M/100.000 il se produit un phénomène analogue pour les microbes capables de se reproduire, mais il est plus atténué, probablement parce que le sel d'argent est moins toxique à cette concentration. Les autres concentrations étudiées : M/500.000, M/1.000.000, M/5.000.000, M/10.000.000 et M/100.000.000, donnent des résultats qui se rapprochent de plus en plus des témoins.

Les heures auxquelles sont atteints les nombres maximum de germes sont très variables : soit à 24 heures, soit à 48 heures ou à 72 heures. Les chiffres maximum de microbes visibles sont atteints en général à 48 heures pour les concentrations les plus fortes, à 72 heures pour les concentrations les plus faibles, et à 24 heures pour les concentrations intermédiaires. Les microbes capables de se reproduire arrivent à leur valeur maximum en général à 24 heures. Signalons cependant qu'aux concentrations les plus faibles, ce maximum est atteint à 48 heures, et aux concentrations défavorables, à 72 heures. Les quantités maximum de microbes visibles sont d'ailleurs toujours nettement inférieures aux nombres maximum trouvés pour les cultures-témoins. Ces derniers varient en effet de 4 milliards et demi à plus de 6 milliards, alors que les cultures se développant sur des concentrations plutôt faibles (M/500.000, M/1.000.000, M/5.000.000), ont des maximum qui ne chiffrent pas 1 milliard et demi et que les cultures à concentrations encore plus faibles (M/10.000.000, M/100.000.000) n'atteignent respectivement que 3 milliards et demi et 4 milliards de germes.

Même caractéristique en ce qui concerne les chiffres maximum

de microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose. Ils n'atteignent jamais 2 milliards, alors que les témoins varient de 2 milliards et demi à 3 milliards et demi. De plus, lorsque ces microbes sont arrivés à leur nombre maximum, ils subissent une phase de déclin très rapide (exception faite pour les doses : $M/10.000.000$ et $M/100.000.000$), même pour des concentrations déjà faibles comme $M/500.000$, $M/1.000.000$ et $M/5.000.000$. Des particularités telles que : nombre maximum de microbes obtenu toujours très inférieur à celui des témoins, chute rapide de ce nombre une fois le maximum obtenu (et cela même pour des concentrations faibles), sont vraisemblablement attribuables à la grande toxicité de l'argent, même très dilué, dont nous avons parlé ci-dessus, phénomène qui nous avait incité à expérimenter l'action de cet élément sur la multiplication du bacille pyocyanique.

b) *Allure des courbes de croissance :*

1° *Microbes visibles :*

Les courbes représentant la poussée de ces microbes ne montrent pas de phase de latence. La phase logarithmique commence immédiatement pour s'arrêter à 9 heures (parfois à 6 heures). La phase de multiplication ralentie a une longueur variable, le maximum étant atteint soit à 24 heures, soit à 48 heures, soit à 72 heures. Nous n'avons pas trouvé réellement de phase logarithmique pour les dilutions $M/10.000.000$ et $M/100.000.000$; il ne semble y avoir qu'une longue période de multiplication ralentie.

2° *Microbes capables de se reproduire après repiquage sur gélose :*

Les courbes traduisant la poussée de ces microbes présentent toutes une phase de latence d'au moins 3 heures. Parfois celle-ci atteint 6 heures ($M/5.000.000$ et $M/10.000.000$), voire 24 heures ($M/10.000$ et $M/100.000$). Dans ce dernier cas, la courbe présente même une *inflexion*, qui traduit une diminution de ces microbes. Cette inflexion qui est très prononcée pour $M/10.000$ est plus atténuée pour $M/100.000$. Dans ces deux cas, la phase de latence semble donc interrompue par une diminution brusque du

nombre des microbes, — diminution se faisant entre la 3^e et la 6^e heure. Comme pour le sel mercurique étudié, cette diminution brusque doit être la conséquence d'un phénomène de toxicité.

En résumé, ces courbes montrent nettement que le nitrate d'argent agit comme un inhibiteur de la multiplication du bacille pyocyanique. Quelle que soit la dose employée, on peut observer l'action toxique de ce sel. Ces résultats sont conformes à ceux qui ont été trouvés par G. BERTRAND. Rappelons qu'ils ne sont pas en faveur de l'hypothèse selon laquelle : les excitations de développement produites par certains corps proviennent d'une « réaction à une intoxication ».

2^o *Influence du nitrate d'argent à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique.*

a) *Rapport de vitalité :*

Nous donnons ci-contre les valeurs de ce rapport aux heures des différents prélèvements (Ag = cultures sur nitrate d'argent, T = cultures-témoins).

Comme pour les autres sels étudiés, le rapport de vitalité décroît partout pendant les trois premières heures. Mais au lieu de se remettre à croître, comme nous l'avons vu en général jusqu'à présent, il *continue de décroître* jusqu'à la 6^e heure. De la 6^e heure à la 9^e heure, il subit une légère augmentation, pour augmenter très brusquement à 24 heures et pour atteindre une valeur maximum se rapprochant de l'unité (0,8 et 0,9) ; il décroît alors en général assez rapidement.

Répetons à ce propos que ce n'est pas pour les plus faibles concentrations que le rapport de vitalité atteint son maximum. Les valeurs 0,8, 0,9, et 0,9 sont, en effet, atteintes pour les concentrations M/500.000, M/1.000.000 et M/5.000.000, alors que pour les concentrations les plus faibles M/10.000.000 et M/1.000.000.000, les valeurs atteintes à 24 heures ne sont respectivement que 0,3 et 0,5. Il est à remarquer que le rapport de vitalité diminue très vite, quand il atteint ces très fortes valeurs et qu'il diminue beaucoup plus lentement lorsqu'il s'agit des

HEURES DES PRÉLÈ- VEMENTS		CONCENTRATIONS DE NITRATE D'ARGENT EXPÉRIMENTÉES																
		M <u>1.000</u>	M <u>5.000</u>		M <u>10.000</u>		M <u>100.000</u>		M <u>500.000</u>		M <u>1.000.000</u>		M <u>5.000.000</u>		M <u>10.000.000</u>		M <u>100.000.000</u>	
			Ag	T	Ag	T	Ag	T	Ag	T	Ag	T	Ag	T	Ag	T	Ag	T
0		Toxique	0,3	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,6	0,5	0,6	0,3	0,6	0,3	0,5	0,3	0,5
3			0,03	0,03	0,1	0,03	0,3	0,03	0,06	0,1	0,1	0,1	0,06	0,1	0,01	0,1	0,01	0,1
6			0,04	0,09	0,01	0,09	0,04	0,07	0,02	0,2	0,01	0,2	0,01	0,2	0,002	0,1	0,009	0,1
9			0,002	0,3	0,03	0,3	0,04	0,2	0,03	0,1	0,03	0,1	0,06	0,1	0,04	0,1	0,2	0,1
24			0	0,6	0,07	0,6	0,01	0,6	0,8	0,8	0,9	0,8	0,9	0,8	0,3	0,6	0,5	0,6
48				0,2	0,1	0,2	0,2	0,3	0,1	0,2	0,1	0,2	0,1	0,2	0,5	0,4	0,7	0,4
72			0,7	0,6	0,7	0,2	0,6	0,06	0,1	0,1	0,1	0,06	0,1	0,3	0,4	0,03	0,4	
6 jours			0,2	0,3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,3	0,003	0,3	0,02	0,3	0,3	0,1	0,02	0,1	

plus faibles concentrations pour lesquelles il atteint des valeurs moins élevées. C'est ainsi qu'il se maintient à 0,3, à la concentration M/10.000.000, au bout de 6 jours.

b) *Conservation :*

Voici, pour chaque concentration, les temps qui correspondent au dernier prélèvement ayant donné un repiquage positif.

Concentrations	M 500	M 1.000	M 5.000	M 10.000	M 100.000	M 500.000	M 1.000.000	M 5.000.000	M 10.000.000	M 100.000.000
Culture sur nitrate argent	0	6 heures	30 jours	10 mois (vivait encore)	10 jours	10 mois	10 mois	10 mois	12 mois (vivait encore)	12 mois (vivait encore)
Témoin	10 mois	10 mois	10 mois	1 mois	1 mois	12 mois	12 mois	12 mois	10 mois	10 mois

Nous avons observé qu'à une concentration plutôt défavorable : M/10.000, des repiquages effectués au bout de 10 mois poussent abondamment et présentent une belle fluorescence. De même, à des concentrations plus faibles telles : M/500.000, M/1.000.000, et M/5.000.000 où le sel d'argent s'est montré toxique, les cultures conservent pendant 10 mois la possibilité de donner par repiquage des cultures abondantes et bien pigmentées. Les cultures dont les concentrations sont les plus faibles M/10.000.000 et M/100.000.000, vivent encore au bout de 12 mois et donnent, après repiquage, des cultures abondantes. Nous avons donc ici encore l'exemple d'un milieu où la multiplication bactérienne, quoique rendue plutôt difficile par la présence de nitrate d'argent à une certaine concentration (M/10.000), permet aux germes une longue conservation.

3° *Influence du nitrate d'argent à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique.*

a) *Morphologie :*

La morphologie de ce microbe subit des variations selon les concentrations de nitrate d'argent employées. Pour des concentrations plutôt défavorables : M/5.000, M/10.000 et M/100.000, les germes sont plus courts et plus grêles que les témoins. Pour les concentrations allant de M/500.000 à M/100.000.000, ils sont, par contre, plus gros que les témoins correspondants, plus épais, et ils fixent très énergiquement le colorant, surtout pendant les premières heures de poussée. Pour ces concentrations, nous avons noté que les bacilles se colorent d'ailleurs beaucoup plus intensément à leurs extrémités qu'en leur milieu, et prennent de ce fait « une apparence sporulée ». Cette particularité a été observée surtout à 24 heures et à 48 heures.

b) *Pigmentation :*

Aux concentrations M/500 et M/1.000, nous n'avons jamais vu apparaître de pigment. La culture contenant M/5.000 de nitrate d'argent est devenue fluorescente vers 72 heures. La concentration M/10.000 a présenté une pigmentation *verte extrêmement marquée* déjà vers 48 heures, atteignant son maximum d'intensité à 72 heures. Il en a été de même quant à la concentration M/500.000. Par contre, les autres concentrations : M/100.000, M/1.000.000, M/5.000.000, M/10.000.000 et M/100.000.000, ont donné naissance à des pigments beaucoup plus atténués et dont l'apparition s'est produite plus tardivement : vers le 6^e jour seulement.

Soulignons donc qu'il existe deux concentrations : M/10.000 et M/500.000 pour lesquelles la pigmentation est bien plus accentuée, bien qu'à ces deux doses le sel d'argent étudié semble avoir encore une action nettement toxique. (Nous avons d'ailleurs signalé un cas analogue à propos de la vitalité de ces germes).

CONCLUSIONS DE LA DEUXIÈME PARTIE

De l'ensemble de nos observations, il est possible de tirer les conclusions suivantes :

1^o Certains sels métalliques (nitrate de lanthane, nitrate de cérium, nitrate de plomb, nitrate mercurique, nitrate d'argent), ajoutés au milieu de culture, modifient le cours de la multiplication du bacille pyocyanique selon le degré de leur concentration.

2^o Pour certains d'entre eux (nitrate de lanthane, nitrate de cérium, nitrate de plomb et nitrate mercurique), nous pouvons envisager trois zones de concentrations :

a) Des concentrations qui provoquent l'inhibition de la poussée;

b) Des concentrations plus faibles, pour lesquelles on observe un développement des bactéries qui se rapproche beaucoup de celui des cultures-témoins;

c) Des concentrations encore plus faibles, qui provoquent *une exaltation de la poussée*. C'est ce phénomène de « stimulation » que nous nous étions proposé de vérifier et que nous avons pu mettre nettement en évidence.

3^o En ce qui concerne *le nitrate d'argent*, nous n'avons pas noté l'existence de doses favorisant la multiplication. Nous avons constaté un freinage de la multiplication, freinage se manifestant même à de faibles concentrations; nos résultats sont donc semblables à ceux qui ont été déjà trouvés par G. BERTRAND pour l'*Aspergillus niger*;

4^o Il n'y a pas de proportionnalité entre la dilution du sel étudié et la stimulation. De plus, parfois, sans raisons apparentes, la série des doses excitantes est interrompue brusquement

par une concentration indifférente. Ce cas peut être constaté notamment pour le nitrate mercurique et le nitrate de plomb ;

5° Il ne nous semble pas qu'on puisse établir de rapports entre les concentrations excitantes et la valence des métaux envisagés. Ce résultat est conforme aux expériences d'un certain nombre d'auteurs.

6° Les courbes de poussée obtenues à partir des cultures-témoins nous ont permis de retrouver les diverses phases de croissance mises en évidence et confirmées par J. REGNIER et ses élèves, à savoir :

a) Pour les microbes visibles : une phase logarithmique, une phase de multiplication ralentie et une phase de déclin ;

b) Pour les microbes capables de se reproduire après dilutions et repiquage sur gélose ; *une phase de latence*, une phase logarithmique, une phase de multiplication ralentie et une phase de déclin.

Les milieux, quoique ayant été appauvris par une dialyse de 15 jours, ont parfaitement convenu à la multiplication du bacille pyocyanique. Les courbes de poussée, aussi bien pour les microbes visibles que pour les microbes capables de se reproduire, ont la même allure que les courbes traduisant des multiplications effectuées dans des milieux nutritifs plus riches.

La présence dans les cultures d'un des sels étudiés maintient en général (exception faite des concentrations toxiques), en leur faisant subir certaines modifications, l'existence de ces différentes phases. C'est ainsi que, pour des doses peu favorables, la phase de latence est plus ou moins allongée ; la phase logarithmique peut être notablement diminuée ou peut même disparaître.

Dans le cas de métaux très antiseptiques, tels le mercure et l'argent, la courbe présente pendant la phase de latence *une ou deux inflexions*. Celles-ci traduisent la disparition des germes les plus fragiles, sous l'influence du métal toxique.

Cette action toxique, génératrice d'un allongement de la phase de latence, est en général suivie par un *déclenchement brusque* de la poussée ; le nombre maximum de germes est rapi-

dement atteint et aussitôt succède une phase de déclin plus ou moins rapide.

7° Il est intéressant de souligner que *toutes* nos cultures (cultures-témoins et cultures avec cations), n'ont *jamais* présenté le voile caractéristique du bacille pyocyannique. Ceci est à rapprocher d'observations analogues faites par R. DAVID concernant des cultures du même bacille sur certains milieux peu chargés en matières nutritives.

8° Nous avons également constaté que ce ne sont pas les milieux provoquant les multiplications les plus abondantes et les plus rapides qui donnent aux germes la vitalité la plus grande. Très souvent, nous avons noté que des concentrations peu favorisantes fournissent *un rapport de vitalité* plus élevé et d'une plus longue durée que certaines concentrations très stimulantes.

9° En ce qui concerne *la conservation* des souches contenant certains cations, nous pouvons faire une remarque identique : les conservations les plus longues ne sont pas toujours obtenues pour les concentrations les plus faibles et, partant, les plus favorisantes.

10° Nous pourrions faire encore une remarque analogue en ce qui concerne la production des pigments : ce n'est pas toujours dans les milieux où la concentration du sel est la plus favorable à la multiplication du bacille pyocyannique que l'apparition de son pigment est la plus rapide et la plus accentuée. Nous avons signalé des doses de certains sels, quoique peu propices à une bonne multiplication, pour lesquelles nous avons observé une magnifique pigmentation.

11° Nous avons observé que la *morphologie* des bacilles peut être influencée par certaines concentrations de sels métalliques. Les bacilles pyocyaniques sont d'autant plus gros et prennent d'autant mieux le colorant que les concentrations des sels étudiés sont plus favorables à leur multiplication. A des concentrations peu favorables ou toxiques, ils deviennent généralement très courts, — exception faite pour le nitrate de plomb dont certaines concentrations tout au plus indifférentes, laissent cependant

apparaître des bacilles aussi beaux que ceux produits dans les concentrations optima, — pour ressembler finalement à des cocobacilles et même à des cocci.

12° R. DAVID, dans son étude sur la multiplication du bacille pyocyanique en différents milieux de culture, a remarqué que des bouillons, de préparation identique, mais obtenus à des « fournées » différentes, ne donnent pas toujours les mêmes résultats. Il indique que ces différences peuvent être expliquées soit par la composition un peu différente des matières premières employées à la confection de ces milieux, soit par des différences dans les durées et les degrés du chauffage employé pour la stérilisation. Nous partageons cette opinion. Elle pourrait peut-être expliquer en partie l'écart qui se manifeste parfois entre les chiffres maximum des microbes visibles des cultures-témoins.

Par contre, nous avons trouvé des résultats plus réguliers en ce qui concerne les microbes capables de se reproduire sur gélose des cultures-témoins. Les maximum approchent toujours 2 milliards et demi dans la majorité des expériences.

13° Bien que nous préférions la technique de numération des colonies qui se développent sur plaques de gélose, après dilutions et ensemencement, son emploi, conjugué avec la méthode microscopique comparative de WRIGHT-FRIES, nous paraît recommandable. Cette méthode de travail nous a été d'une grande utilité. En effet, c'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence l'existence de doses favorisantes de nitrate mercurique. L'emploi de la méthode des plaques seule n'aurait montré qu'une action toxique ou indifférente. C'est peut-être pour cette raison (emploi de la méthode des plaques seule), que certains auteurs n'ont pu établir l'existence de doses favorisantes pour les sels de mercure.

14° Observations sur la loi d'ARNDT-SCHULZ : nous avons bien trouvé qu'il peut exister des doses excitantes, indifférentes et toxiques de la multiplication du bacille pyocyanique pour une même substance selon les concentrations auxquelles elle est utilisée. Mais nous n'avons pas trouvé une telle action excitante avec le nitrate d'argent, que nous avons pourtant expérimenté à de très faibles concentrations.

Nous pensons qu'il faudrait étudier encore un très grand nombre de substances avant de se faire une opinion définitive à cet égard et de généraliser ces phénomènes.

En effet, nous avons vu que certains auteurs avaient également noté des exceptions. Parmi ceux-ci, rappelons que BRAMBRING, Mlle LEVY, n'ont jamais pu mettre en évidence l'existence de doses favorisantes en ce qui concerne l'aluminium et que NIETHAMMER a fait des remarques analogues pour le sulfate de cuivre et le sulfate de nickel. Enfin, d'autres auteurs ont observé que le nitrate d'argent n'exerçait jamais d'action favorisante : RAULIN, G. BERTRAND, NÆGELI, VINCENT, etc., ont montré depuis longtemps sa toxicité même à de grandes dilutions.

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

Nous venons de mettre nettement en évidence la possibilité d'exciter et de favoriser la multiplication microbienne par l'addition de très petites quantités de certains sels métalliques, dans les milieux de culture et, par l'addition de quantités plus grandes, la possibilité d'inhiber cette multiplication. Nous avons également exposé quelques hypothèses tendant à expliquer ces phénomènes.

Nous nous sommes demandé si les phénomènes d'exaltation ou d'inhibition de la multiplication microbienne par certains sels de métaux lourds, n'étaient pas accompagnés de variations *des charges électriques* microbiennes, variations déterminées par ces ions polyvalents positifs, conformément à ce qu'avaient déjà observé P. GIRARD et R. AUDUBERT (186). Aussi avons-nous voulu vérifier cette hypothèse dans la dernière partie de notre travail. Ces recherches ont été effectuées en deux temps :

1° Nous avons d'abord voulu voir si les charges électriques des microbes varient au cours de la multiplication bactérienne normale, comme varie la courbe qui traduit cette multiplication.

2° Nous avons recherché ensuite si les charges des microbes varient sous l'action des sels de métaux lourds, en particulier du nitrate de lanthane.

Avant de parler des résultats obtenus, il nous semble utile de rappeler ce qu'on entend par *électrisation de contact* entre matière inorganique et liquide ionisant.

I. — Notion de charge électrique en général. Électrification de contact des substances inertes.

Nous savons qu'une paroi quelconque, du verre par exemple, plongée dans un liquide ionisant tel que l'eau *s'électrise par contact*, c'est-à-dire se recouvre d'une couche double constituée par deux feuillets électriques de signes contraires, l'un adhérent à la paroi, l'autre situé dans le liquide, à distance notable de cette paroi.

Cette électrisation de contact se manifeste (1) :

1^o *Par l'osmose électrique* qui consiste en ce que : « lorsqu'on « établit une différence de potentiel entre les deux régions que « sépare, dans un liquide, un diaphragme poreux, ce liquide se « met aussitôt à filtrer au travers du diaphragme. Un tel di-
« phragme est sans doute plus ou moins équivalent à un faisceau
« de tubes capillaires parallèles. Et, en effet, QUINCKE réussit à
« produire l'osmose électrique en créant une différence de poten-
« tiel entre deux masses liquides réunies par un tube unique. »

2^o Réciproquement, QUINCKE prévient et vérifie que, si, en l'absence de champ, nous forçons mécaniquement le liquide à s'écouler dans le tube sous l'action d'une différence de pression, il entraînera les charges mobiles qui s'accumuleront à une extrémité créant une différence de potentiel entre les deux masses liquides que réunit le tube : c'est *la force électromotrice de filtration*.

3^o « Si maintenant nous supposons pulvérisée et en suspension dans le liquide la matière qui constituait tout à l'heure le « diaphragme immobile, nous comprendrons qu'elle doit encore « se charger de même ; mais les particules, maintenant mobiles, « qui la constituent, se déplaceront sans doute sous l'action du « champ dans le sens inverse à celui où coulait tout à l'heure le « liquide. »

C'est l'origine de l'électrophorèse ou transport des particules chargées dans un champ électrique.

RÈGLES D'ÉLECTRISATION

Elles ont été découvertes par M. Jean PERRIN (369), qui a étudié d'une façon systématique l'osmose électrique avec des

(1) Nous empruntons ces exemples à la thèse de Doctorat ès Sciences de M^{lle} CHOUCROUN (77).

parois très différentes (chlorure de chrome, charbon, naphthaline, alumine, soufre, etc...)

1^o Action des ions H^+ et OH^- .

« Quand une paroi est plongée dans de l'eau pure (où elle « peut être positive, négative ou neutre) ou, plus généralement, « dans une solution aqueuse ne contenant que des ions mono-
« valents, son potentiel s'élève toujours quand on ajoute de l'acide
« monovalent et s'abaisse toujours quand on ajoute de l'alcali
« monovalent ». En milieu acide, la paroi se revêt donc de charges positives (formées par les ions H^+) et en milieu alcalin, elle se revêt de charges négatives (formées par les ions OH^-).

2^o Action des ions polyvalents :

« Un ion polyvalent négatif abaisse toujours le potentiel d'une
« paroi plongée dans un milieu acide ; un ion polyvalent positif
« élève toujours le potentiel d'une paroi plongée dans un milieu
« alcalin ; l'une et l'autre variation pouvant aller jusqu'au renver-
« sement du signe de la paroi. »

Les ions H^+ ou OH^- « mordant » en quelque sorte sur la paroi, les ions polyvalents ayant un signe contraire. Les expériences ayant permis l'élaboration de ces règles montrent donc que les ions H^+ et OH^- jouent un rôle prépondérant dans les phénomènes d'électrisation. La présence de ces ions H^+ ou OH^- , qui agissent soit directement, soit par mordantage d'ions polyvalents du signe opposé, constitue un facteur général d'électrisation (ou de charge électrique).

Nous pouvons illustrer ces lois par les exemples suivants :
Considérons une paroi de chlorure de chrome ; elle est neutre dans un milieu neutre ; elle devient positive si le milieu est acide (présence de $Cl H$ par exemple) et même faiblement acide ($Cl H$ n/1.000) ; elle devient négative si le milieu est alcalin (présence de $Na OH$ par exemple) et même faiblement alcalin ($Na OH$ n/1.000). Cette paroi reste neutre si l'on ajoute du ferrocyanure de potassium ou du nitrate de lanthane au milieu. Mais, si avec le ferrocyanure de potassium on ajoute de l'acide chlorhydrique, les ions H^+ de l'acide « mordant » les ions $Fe Cy_6^{---}$ et la paroi prend un signe négatif ; de même, si avec le nitrate de lan-

thane on ajoute de la potasse, les ions OH^- de la base « mordant » les ions La^{+++} et la paroi devient positive.

Nous pouvons résumer ceci dans le tableau suivant :

Paroi	Milieu dans lequel est cette paroi	Signe pris par la paroi
Cr Cl^3	neutre	neutre
—	H Cl (même à $n/1000$)	+
—	Na OH (même à $n/1000$)	—
—	Fe Cy^6 — — — — K^4	neutre
—	$\text{Fe Cy}^6 \text{K}^4$ + H Cl	—
—	$(\text{NO}^3)^3 \text{La}^{+++}$	neutre
—	$(\text{No}^3)^3 \text{La}^{+++}$ + K OH	+

Nous mentionnerons encore que d'après Mlle CHOUCROUN, il convient d'ajouter aux règles sur l'action des ions polyvalents, la règle suivante : « *En milieu neutre un ion polyvalent agit sur une paroi qui est déjà chargée par ionisation superficielle avec le signe contraire, en diminuant le potentiel de la paroi si elle est positive ; en l'augmentant si elle est négative.* »

II. — Charge électrique des bactéries.

1° Existence de la charge.

L'existence de la charge des bactéries est révélée par leur déplacement dans un champ électrique. Le sens de ce déplacement indique le signe de cette électrisation. L'existence et le signe de la charge électrique des microbes peut être vérifiée :

a) Soit par l'emploi des méthodes d'électrophorèse, qui étudient le déplacement des microbes dans un champ électrique.

b) Soit par l'agglutination des microbes par addition d'acides ou de sels polyvalents, à l'émulsion bactérienne. Ce sont les méthodes d'électrophorèse qui ont permis les observations les plus justes et les plus précises et les auteurs qui les ont employées sont de beaucoup les plus nombreux.

LORTET (309) en 1896, semble être le premier auteur qui ait fait des observations intéressantes. Il écrit à ce sujet : « Les bactéries, sous l'influence du courant, ne se touchent point bouts à bouts, comme des corps polarisés devraient le faire. Elles ne se placent que parallèlement entre elles et au courant. Soumises pendant près de 12 heures à l'influence d'un courant extrêmement énergétique, les bactéries n'en paraissent nullement affectées, car elles reprennent tous leurs mouvements dès que le courant est arrêté. Pour que les bactéries puissent ainsi être influencées, il faut qu'elles aient conservé la propriété de se mouvoir. »

Lortet signale, en effet, que des microbes vieilliss ou soumis à l'action d'une substance antiseptique, ne s'orientent plus sous l'influence du courant. Parlant de l'orientation immédiate des bactéries dans le sens du courant, il conclut : « Cette propriété n'est point physique seulement, mais bien en rapport direct avec la vitalité de leur protoplasma. » En 1867, cet auteur avait déjà fait connaître que les spermaties des champignons et des lichens subissent la même influence lorsqu'ils sont vivants. Lortet semble donc avoir été le premier auteur à faire l'observation que des bacilles mobiles placés dans un champ électrique s'orientent instantanément dans le sens du courant et c'est également lui qui, le premier, a précisé l'influence de l'addition d'antiseptiques sur cette variation.

NEISSER et FRIEDMANN (351), en 1904, ainsi que BECHHOLD (22), la même année ont été les premiers à indiquer le signe de l'électrisation des bactéries. Ce dernier a étudié le transport électrique des microbes en employant un tube en U, qui contient la suspension bactérienne et dans laquelle plongent les électrodes. Malgré l'imperfection de cet appareil, l'auteur a observé un éclaircissement de la suspension au voisinage de l'électrode négative et il en conclut que les bactéries se dirigent vers l'anode.

En 1906, Mlle CERNOVODEANU et V. HENRI (68) ont apporté des faits nouveaux : employant le procédé microscopique, ces auteurs ont étudié le transport électrique du bacille du charbon, du bacille coli, du bacille typhique, du bacille tuberculeux, du bacille de la phléole, du staphylocoque doré, du bacille dysentérique de Flexner. Les microbes sont émulsionnés dans de l'eau distillée, un petit peu de cette émulsion est placée dans une chambre humide munie de deux électrodes permettant l'arrivée

d'un courant de faible intensité. Ils ont trouvé ainsi que tous ces germes avaient une charge électrique négative, sauf le bacille dysentérique de Flexner qui porte une charge positive. En acidifiant le milieu, ils ont noté une grande diminution de la charge, laquelle peut même devenir nulle.

Ph. LASSEUR en 1921 (285), et le même auteur avec ses collaborateurs Mlle DUPAIX (292), P. JOUFFROY (287), et R. FRIBOURG (288), à partir de 1928, ont étudié systématiquement par la méthode macroscopique et la méthode microscopique le signe d'un certain nombre de microbes parmi lesquels : le bacillus prodigiosus, le bacillus balticus, le bacillus chlororaphis, le bacillus caryocyaneus, le bacillus pyocyaneus erythrogenes, le bacille typhique, le bacille paratyphique A, les bacilles dysentériques de Shiga et de Flexner, le bacille coli et le pneumobacille; ceux-ci se sont montrés tous sans exception chargés négativement.

Il est encore intéressant de signaler que les travaux de CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN (86) en 1923, puis de KOFMAN (270), en 1927, ont confirmé que tous les microbes sont chargés négativement, sauf les bacilles dysentériques de Flexner, de Shiga, de Hiss, et les paratyphiques B, qui sont chargés positivement. Ces auteurs ont remarqué aussi que certains microbes, tels le paratyphique A et le bacillus fœcalis alcaligenes, changent de signe suivant l'âge de la culture d'où provient le microbe.

De nombreuses observations faites à l'occasion de recherches diverses par un grand nombre d'auteurs ont confirmé l'existence et le signe de la charge électrique des microorganismes.

Nous nous bornerons à en indiquer la liste dans l'ordre chronologique (1) et les références bibliographiques.

(1) Ce sont : KUHNE (280) (1864), TEAGUE et BUXTON (476) (1907), BUXTON et SHAFFER (59) (1907), COTTON et MOUTON (92) (1906), C. RUSS (419) (1909), H. BENIASCH (27) (1911-1912), P. SCHMIDT (429) (1913), J. F. ABBOTT (1) (1908), W. M. THORNTON (483) (1912), J. A. ARKWRIGHT (10) (1914), G. SALUS (422) (1917), P. GIRARD et R. AUDUBERT (186) (1918), SHEARER (445-446) (1919-1922), GOVAERTS (192) (1920), E. PUTTER (384) (1921), J. H. NORTHROP et P. H. de KRUIF (359) (1921-1922), WINSLOW et SHAUGHNESSY (513) (1924), C. E. A. WINSLOW, I. S. FALK et M. F. CAULFIELD (511), FALK et ses collaborateurs (147 à 151) (1924-1925-1928), R. TITSLER et M. LISSE (486) (1928), E. SORU (459) (1929), LISBONNE et SEIGNEURIN (307) (1933), E. SORU (460) (1934), A. CARDIN (61) (1934), M. TALENTI et D. LÉONARDI (475) (1935), R. SEIGNEURIN (439) (1935). Quant à R. HOBBER (235) (1914) et à von SZENT-GYORGYI (474) (1921), ils ont observé que les levures ont un comportement analogue à celui des microbes, lorsqu'elles sont placées dans un champ électrique.

Les premières mesures quantitatives précises semblent avoir été faites par Mlle CHOUCROUN, grâce à son dispositif correct d'électrophorèse que nous décrirons plus loin. C'est à cet auteur que nous devons d'avoir compris certains caractères particuliers de l'électrisation superficielle de la matière vivante. LORTET avait déjà observé, sans en rien tirer, l'orientation des bactéries dans un champ électrique. Mlle Choucroun a constaté la même propriété, mais de plus, elle a observé que, si l'on inverse le sens du champ, le bâtonnet se retourne par une sorte de *tête-à-queue*, de façon que le bacille dirige toujours la même extrémité vers l'électrode qui l'attire.

Ceci démontre que l'électrisation n'est pas uniforme le long de la surface du bacille.

Alors que l'électrisation des particules constituées par une substance homogène inerte, comme la gomme-gutte, apparaît uniforme à notre échelle d'observation, nous trouvons avec les bactéries *une répartition hétérogène* de l'électrisation, caractère intéressant de la matière vivante, qui révèle sans doute une structure qui échappe à l'observation morphologique.

Un caractère plus important a été également signalé pour la première fois par Mlle CHOUCROUN.

Alors que les particules d'une même substance inerte ont toutes la même électrisation avec des mobilités égales — aux fluctuations du mouvement brownien près — dans le champ électrique, Mlle Choucroun a constaté des différences très grandes de mobilité entre les différents bacilles d'une même émulsion, la mobilité pouvant varier de 1 à 10.

Néanmoins, la majorité des bacilles ont des mobilités voisines, se répartissant autour d'une mobilité fréquemment rencontrée. C'est cette *mobilité prépondérante* qui doit être prise pour caractériser l'émulsion. De façon plus précise, on ne peut caractériser l'électrisation des bacilles d'une émulsion par un chiffre (comme l'ont fait tous les expérimentateurs jusqu'à Mlle Choucroun), mais par une courbe de répartition statistique des électrisations, c'est-à-dire des mobilités.

Ce caractère très important a imposé une méthode d'observation qui s'est révélée féconde, puisqu'elle a permis à Mlle Choucroun de déceler au sein d'une espèce bactérienne « sauvage », des populations ayant chacune leur hérédité propre, chaque popu-

lation ou « lignée pure » étant caractérisée au point de vue de son électrisation par une *courbe de répartition fixe* pour la lignée considérée.

C'est en effectuant une véritable séparation fractionnée par le champ électrique et en cultivant les bacilles ainsi séparés (à des dilutions suffisantes) pour avoir des colonies isolées, que Mlle Choucroun est arrivée à ce résultat important en soi, puisqu'il montre que l'électrisation superficielle est (au même titre que certains caractères morphologiques) *un caractère spécifique* de l'espèce bactérienne, important dans ses conséquences puisque grâce à cette nouvelle méthode, nous avons maintenant un moyen, « *commode et rapide*, de saisir ou de suivre, en dehors « des tests biologiques, les modifications spontanées ou provo-
« quées qui peuvent se produire. »

Mlle Choucroun a signalé de plus (en insistant sur cet autre caractère très important) que la matière vivante ne réagit pas aux causes générales d'électrisation comme la matière inerte. La bactérie, par exemple, semble défendre son électrisation contre les agents minéraux tels que les sels polyvalents qui agissent très facilement sur l'électrisation des substances inertes. C'est ainsi que l'ion trivalent lanthane, qui inverse si aisément et à faible concentration le signe de la plupart des particules inertes, doit être présent à l'énorme concentration de M/100, pour que le signe de la bactérie, *alors tuée*, soit inversé.

Avec M.-A. GUILLIERMOND, Mlle CHOUCROUN (200) a constaté dans l'étude de l'électrophorèse à l'intérieur des cellules végétales que « tant que la cellule est vivante, aucun mouvement ne « se produit dans son intérieur sous l'action du champ. »

« *En d'autres termes, la cellule, tant qu'elle est vivante, protège « ses éléments intérieurs contre l'établissement d'un champ élec-
« trique imposé par l'extérieur, soit qu'on doive la considérer
« comme s'enveloppant d'une gaine conductrice protectrice,
« soit plus vraisemblablement que sa matière se polarise, les
« charges électriques alors développées à sa surface équilibrant
« l'action du champ extérieur, selon des mécanismes d'électro-
« statique bien connus. »* Ces auteurs ont pu vérifier que c'est seulement lorsque la cellule est tuée, que les éléments chargés qui se trouvent à son intérieur, commencent à se déplacer sous l'influence du champ électrique. Cette particularité de la matière

vivante qui se défend contre toute modification apportée à sa charge, se retrouve en ce qui concerne les bactéries.

Nous verrons que nous avons retrouvé ce phénomène dans notre étude de l'action de certains sels polyvalents, comme le nitrate de lanthane, sur le bacille pyocyanique. La bactérie défend énergiquement sa charge et il est très difficile, sinon impossible, de la modifier tant qu'elle est vivante.

Cette propriété sans cesse confirmée constitue une différence fondamentale entre l'électrisation des cellules vivantes et l'électrisation des substances inertes.

III. — Influence de certains facteurs sur l'électrisation des microbes.

1^o *Influence de la concentration en électrolytes de la suspension bactérienne.*

Nous savons bien maintenant que l'existence, le signe et la valeur des charges électriques des bactéries peuvent se vérifier en étudiant le transport de celles-ci dans un champ électrique. Une autre méthode consiste à les modifier jusqu'à ce que les germes précipitent, en ajoutant au milieu, des ions H^+ ou certains ions polyvalents, très chargés en quantités déterminées. Quoique les méthodes de transport soient de beaucoup les plus employées, le second procédé a été utilisé par quelques auteurs, notamment par Ph. LASSEUR (emploi du sulfate d'aluminium et du chlorure ferrique).

WINSLOW et SHAUGHNESSY (514), étudiant cette question sur le *Bacillus cereus*, ont remarqué que la vitesse de déplacement dans le champ électrique s'accroît de $pH = 3,0$ jusqu'à $pH = 10,0$; au-dessus de cette valeur la vitesse de déplacement vers l'anode décroît et il semble y avoir un autre point isoélectrique vers $pH = 12$. Il convient de signaler ici que pour des alcalinités élevées les bactéries ont une tendance à « tamponner » le milieu et à créer, au voisinage immédiat de chaque cellule, une zone ayant un pH inférieur à celui du milieu ambiant. Cette action-tampon se manifeste en ce que les cellules présentent d'abord une vitesse de déplacement considérable, et que celle-ci diminue à mesure que leur pouvoir de tampon s'épuise.

C.-E.-A. WINSLOW, I.-S. FALK et M.-F. CAULFIELD (511), ont

observé que la migration vers l'anode est fonction de la réaction du milieu et que la présence de sels neutres en diminue la vitesse, l'action des sels de calcium étant supérieure à l'influence des sels de sodium.

WINSLOW et SHAUGHNESSY ont également cherché à voir si cette charge est réversible : à pH 13,8 une culture de *Bacillus cereus* montre une vitesse de 9μ 8 par seconde vers la cathode ; en ajoutant de l'acide chlorhydrique de façon à ramener le pH à 6,6, ils ont observé un mouvement vers l'anode avec une vitesse de 5μ 2. A ce sujet, il convient de signaler que le renversement du signe des bactéries a été observé également par TEAGUE et BUXTON (476), en 1907, avec le bacille pyocyanique, par NORTHROP (358) et par Ph. LASSEUR en 1921, avec le *B. pyocyaneus*, le *B. chlororaphis*, le *B. balticus*, le *B. prodigiosus*. Nous verrons plus loin qu'avec Mlle CHOUCROUN nous avons pu renverser le signe du bacille pyocyanique, par une addition suffisante de nitrate de lanthane à la suspension de ce microbe, *mais la dose ainsi ajoutée provoquant la mort des bacilles, ce sont donc des microbes tués qui ont eu leur charge inversée.*

M. TALENTI et D. LEONARDI (475), en 1935, cherchant si la charge électrique de certains microbes se modifie par le changement de la concentration en ions H du milieu de culture, ont constaté que, dans ces nouvelles conditions, la charge électrique reste la même (c'est-à-dire que les bacilles paratyphiques demeurent électro-positifs) et que les autres micro-organismes étudiés restent électro-négatifs. Ils observent un ralentissement net de la vitesse des germes, seulement pour certains pH, qui doit correspondre pour eux au point iso-électrique des micro-organismes en question.

Ph. LASSEUR et P. JOUFFROY (287) n'ont pas observé « de parallélisme étroit entre la vitesse de déplacement et l'agglutinabilité des germes » produite par l'addition, au milieu, d'électrolytes comme le chlorure de sodium, l'acide chlorhydrique, l'acide sulfurique, le perchlorure de fer, le sulfate d'aluminium. Ces auteurs ont mis de plus en évidence que « bien que transportés sensiblement avec la même vitesse, les bacilles de Shiga et de Flexner résistent inégalement à l'action précipitante des ions positifs », ajoutant à ce sujet : « Des résistances inégales à l'action précipitante des ions positifs n'impliquent pas forcément des variations de charges importantes » ; ils suggèrent « qu'il

serait nécessaire de soumettre au transport électrique un grand nombre de souches provenant d'une même espèce microbienne. »

Cette précipitation des bactéries par les acides a d'ailleurs fait l'objet de nombreux travaux que nous ne pouvons que signaler ici (1). De toutes ces recherches, il résulte que l'électrophorèse des microbes ne pourra être commodément et sûrement étudiée que dans des milieux très pauvres en électrolytes; il faudra donc rejeter tout liquide trop riche en électrolytes (en particulier la solution physiologique à 9 0/00 de Na Cl) pour l'étude du transport électrique.

2° Influence de l'âge de la culture.

CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN (86) ont montré que la valeur des charges électriques est fonction de l'âge des cultures ayant servi à la préparation des émulsions. A. CARDIN (61), en 1934, a observé que la rapidité du transport du bacille coli dans un champ électrique diminue avec le vieillissement de ces bactéries. C'est ainsi que dans des cultures âgées de 70 à 80 jours, plus de la moitié des éléments présentent une marche électrophorétique en direction de la cathode. Ph. LASSEUR, qui a également étudié cette question, n'a jamais observé de relation entre la vitesse de transport et l'âge des bactéries qu'elles soient asporogènes ou sporogènes.

En ce qui nous concerne, on verra plus loin que nous avons observé, au contraire, une augmentation de la charge à partir d'un certain âge de la culture, augmentation qui s'est traduite par une plus grande vitesse des germes dans le champ électrique.

3° Influence de la concentration en germes.

Quelques auteurs ont été amenés à considérer l'influence de la concentration en germes. R. SEIGNEURIN (439), en effet, tient le raisonnement suivant : « Lorsque nous déterminons la charge électrique d'une plastide bactérienne par l'électrophorèse, nous mesurons le nombre de charges élémentaires (ou d'ions) que cette dernière a fixées aux dépens du liquide de suspension.

(1) Parmi ceux-ci, nous citerons ceux de : MICHAELIS (325) (326) BENIASCH (27) (1912), ARKWRIGHT (10) (1914), Ph. EISENBERG (135) (1919), FALK et HARRISON (150) (1926), SHEARER (443-445) (1919-1922).

« Par conséquent, pour une dissociation électrolytique déterminée de ce liquide, le nombre de charges fixées devrait, « semble-t-il, varier avec la concentration en germes (diminuer « pour une augmentation de la concentration, et inversement), « d'où variation consécutive du pH avec la concentration, à « moins que l'accroissement de la concentration du gros ion ne « provoque au contraire une dissociation nouvelle du complexe « gros ion (microbe) — ion ordinaire, à supposer qu'il existe — « à la manière d'un équilibre chimique suivant la loi de Guldberg « et Waage. Mais cela supposerait que le microbe en suspension « ressemble au colloïde électrolytique formé de deux ions, l'un « énorme (le germe lui-même), l'autre très petit (un anion quelconque) dont la dissociation est rendue manifeste par l'électrophorèse. » Par suite, Seigneurin est amené à étudier, parmi d'autres faits, la vitesse de transport en fonction de la concentration en germes et il conclut à ce sujet : « La vitesse d'électrophorèse des « microbes varie avec la concentration en germes des suspensions, « suivant des fonctions relativement simples. » Les germes chargés négativement auraient leur vitesse qui diminuerait rapidement jusqu'à une concentration voisine de 1 milliard par cm^3 , au-dessus de laquelle elle reste constante et caractéristique d'un germe donné.

Ph. LASSEUR a également abordé cette question avec R. FRIBOURG (292) en étudiant des émulsions de colibacille à diverses concentrations. Pour ces auteurs, la vitesse de transport varie très peu avec la concentration de l'émulsion, mais ils signalent qu'il faut opérer à un pH égal à 7, la vitesse de transport variant dans les zones plus acides ou plus alcalines.

Pour interpréter les résultats obtenus par les auteurs en ce qui concerne l'influence de certains facteurs sur l'électrisation des microbes, il convient toujours de se demander si les méthodes employées ont été suffisamment correctes et si les substances introduites n'ont pas tué la matière vivante.

En effet, l'emploi d'appareils trop rudimentaires peut occasionner bien des confusions et la mort des microbes fausse complètement l'interprétation des résultats.

De l'aperçu rapide que nous venons de donner, il se dégage que les auteurs envisagés pensent que la concentration du milieu en électrolytes, la concentration en germes et l'âge de la culture influent sur l'électrisation des microbes.

D'après les notions nouvelles apportées par les travaux de Mlle CHOUCROUN, il ressort que l'addition d'électrolytes ne produit pas de grandes variations de l'électrisation, tant que la concentration de substances ainsi ajoutée ne tue pas la matière vivante. (Nous avons vu combien celle-ci défend énergiquement sa charge).

Nous verrons, en effet, lorsque nous exposerons nos travaux personnels, que le nitrate de lanthane modifie nettement l'électrisation du bacille pyocyanique seulement lorsqu'il est ajouté à des concentrations qui altèrent et tuent la matière vivante.

Les variations d'électrisation remarquées par les auteurs ont donc été observées peut-être sur des germes morts.

En ce qui concerne la concentration des germes, nous avons trouvé à l'occasion de nos recherches qu'elle n'a pas d'influence sur la valeur de l'électrisation des microbes. Nous avons vu d'ailleurs que c'était également l'opinion de Ph. LASSEUR.

Quant à l'âge de la culture, on verra également que nous avons observé des variations de la charge, seulement après un temps assez long (15 jours, 3 semaines). Il nous semble que cette influence est plutôt due à la présence de substances actives (vis-à-vis de la charge), secrétées par les bactéries (comme des toxines par exemple), ou par la présence en quantité suffisamment grande de certains produits du métabolisme bactérien.

IV. — Relations entre l'électrisation des microbes et certaines de leurs propriétés.

1^o *Relation entre l'électrisation des microbes et l'espèce de ceux-ci.*

D'après l'ensemble des travaux que nous venons de rappeler, on peut admettre que toutes les bactéries possèdent une charge négative. Certains de ces travaux, ont montré que la valeur de la charge négative était différente selon l'espèce microbienne envisagée :

WEAVER R.-H. (498), en 1932, a pu facilement séparer deux espèces très voisines : *Lactobacillus acidophilus*, et *Lactobacillus*

bulgaricus en utilisant leur valeur différente de charge électrique. Les charges du *Lactobacillus acidophilus* seront dans toutes les souches plus faibles que celles du *Lactobacillus bulgaricus*. CHAPMAN (69), en 1929, a également constaté que des souches de bacille coli portent individuellement des charges caractéristiques, et il a standardisé sa technique afin de représenter chaque souche par une valeur constante. LISBONNE et SEIGNEURIN (307), en 1933, distinguèrent, d'après leur mobilité dans le champ électrique, trois groupes de *Brucella* : le groupe ovin de faible mobilité, les groupes humain et caprin de mobilité moyenne et le groupe bovin plus rapide. ROSENOW E.-C. (415), en 1933, utilisa les différentes vitesses de cataphorèse des diverses espèces de streptocoques pour les caractériser et pour permettre de cette façon le diagnostic de certaines affections. E. SORU (460), en 1934, par contre, n'a pu établir aucune relation entre la valeur de la vitesse de cataphorèse et la classification des vibrions en vibrions cholériques authentiques et en vibrions paracholériques. R. SEIGNEURIN (439), en 1935, a conclu de ses recherches qu'on pouvait classer et distinguer les races microbiennes par leur mobilité. Il a également montré que même les races d'une espèce microbienne donnée avaient chacune une mobilité propre. Nous avons parlé des travaux et des résultats intéressants trouvés par Mlle CHOUCROUN (81-82), en 1936, qui a montré que l'électrisation superficielle de la bactérie peut être considérée comme un caractère spécifique de l'espèce et peut par suite servir à la caractériser. Rappelons ici qu'à la suite d'expériences sur le bacille tuberculeux, et le bacille pyocyanique, Mlle Choucroun a pu conclure : « Qu'une espèce bactérienne *sauvage* apparaît comme constituée « par juxtaposition de populations ayant chacune son hérédité « propre, sortes de *lignées pures* à courbe de répartition fixe en « ce qui regarde l'électrisation. » Il est donc possible de distinguer les diverses *variétés pures* contenues dans une même espèce microbienne en mesurant la valeur des électrisations des individus constituant une émulsion de cette espèce.

A la suite d'expériences sur les variétés « R » et « S » de différentes espèces de bacilles tuberculeux, Mlle Choucroun est arrivée aux conclusions suivantes : « 1° que la mobilité est toujours à peu près la même pour les souches « S », quelle que soit « leur origine, et quel que soit aussi l'âge de la culture ; 2° que « la mobilité n'est pas la même pour les souches « R » d'origines

« différentes et que cette mobilité varie avec l'âge de la culture, « passant généralement par un maximum vers la troisième « semaine; 3° et enfin que la mobilité pour les souches « R » est « toujours supérieure à celle des souches « S » correspondantes. »

Ces expériences mettent donc indiscutablement en évidence, en ce qui concerne les microbes, que les diverses espèces d'un même genre, et même les variétés d'une même espèce peuvent se différencier par la valeur de leurs charges électriques.

2° Relation entre la valeur de la charge électrique des microbes et leur virulence.

On savait que l'agglutinabilité ou la stabilité des émulsions de bactéries virulentes était en corrélation avec leur virulence sur l'animal. La découverte que des variations dans la charge électrique des bactéries étaient associées à ces phénomènes en permit un essai d'explication. FALK, GUSSIN et JACOBSON (147-148), en 1925, FALK et JACOBSON (149), en 1925-1926, ont conçu des expériences pour déterminer les relations entre ces différences de potentiel électrophorétique et la virulence des bactéries. Etudiant diverses variétés de pneumocoques, ils ont mis en évidence un rapport entre leur potentiel et leur virulence vis-à-vis des souris blanches. Pour les pneumocoques des types I, II, III et IV, ils ont trouvé une différence de potentiel d'autant plus élevée que la virulence pour les souris blanches est plus grande. Le type III s'est montré le plus chargé et en même temps le plus virulent. De même, des pneumocoques, isolés à partir de cas mortels de pneumonies aiguës, ont présenté des charges plus élevées que ceux isolés à partir de cas non fatals.

En 1928, FALK et JENSEN (151) ont essayé de différencier les bacilles diphtériques virulents et avirulents d'après la valeur de leur charge électrique. Ils ont trouvé que les microbes virulents possèdent une vitesse moyenne de migration électrophorétique de $3 \mu 4$ par seconde, que les microbes avirulents donnent des valeurs plus élevées allant de $7 \mu 9$ à $12 \mu 1$ par seconde, ce qui leur a fait conclure que les bacilles diphtériques lents, c'est-à-dire les moins chargés, ont un fort pouvoir toxigène. De plus, ces mêmes auteurs ont montré que des souches virulentes diminuent leur sécrétion de toxine quand on augmente leur potentiel électrophorétique, ou l'exaltent quand on diminue leur charge

électrique : c'est ainsi qu'en additionnant le milieu de culture de nitrate de lanthane, de nitrate d'erbium ou de nitrate de thorium, donc en diminuant la charge électrique des bacilles diphtériques, Falk et Jensen ont obtenu un pouvoir toxigène maximum.

H.-C. BROWN et J.-C. BROOM (47), en 1932, faisant des observations sur l'électrophorèse de diverses souches de bacilles typhiques, ont remarqué de grandes variations dans la vitesse de transport de ces microbes et une grande diminution de la charge électrique par l'addition d'un sel polyvalent comme le chlorure de lanthane. Cependant ces auteurs ne semblent pas avoir observé un rapport entre la vitesse de migration électrophorétique et la virulence des microbes.

Mlle CHOUCROUN et H. PLOTZ (80), étudiant les mobilités des variétés R et S des bacilles tuberculeux dissociés des types : Humain (Ratti), Humain (Anna), Bovin Vallée, B. C. G., ont déduit de leurs observations « que la mobilité pour les souches R est toujours supérieure à celle des souches S correspondantes. Comme la souche R est virulente, et la souche S peu virulente, il faut conclure qu'il y a une électrisation plus importante quand la virulence est plus grande. Ces observations confirment donc celles que FALK et ses collaborateurs ont faites au sujet des pneumocoques virulents, qui porteraient une charge plus grande que les pneumocoques non virulents.

3° *Relation entre la réaction de Gram et la charge électrique.*

Quelques auteurs ont fait des recherches à ce sujet : E.-W. STEARNS et A.-F. STEARNS (462-463), en 1924-1925, C.-E.-A. WINSLOW et M.-E. UPTON (515), en 1926, ont trouvé qu'il existe une relation entre la charge électrique et la réaction de Gram.

V. BURKE et Fred.-O. GIBSON (56), en 1933, mesurant la charge électrique de la levure (gram positif) et du *Bacillus escherichia communior* (gram négatif) ont observé que ces germes montrent une migration similaire sous l'influence du courant électrique. Ces deux espèces possèdent une charge négative, altérable par l'addition d'acide ou d'alcali et réversible, sans par cela apporter de modification dans la réaction de Gram.

Signalons encore que des chercheurs ont étudié d'autres relations, susceptibles d'exister entre la charge électrique des microorganismes et certaines de leurs propriétés biologiques, telles : le métabolisme, la vitalité : WINSLOW, FALK et CAULFIELD (511), EGGERTH (132), NORTHROP et de KRUIF (359), en 1922, WINSLOW et FLEESON (512), en 1926; l'agglutination par les sérums agglutinants : Ph. LASSEUR (290), H.-A. ABRAMSON (2 *bis*), TITSLER et LISSE (486).

Nous allons maintenant parler de la détermination quantitative des charges électriques des microbes, puis décrire l'appareil qui a permis d'effectuer ces mesures et ces observations, appareil que nous avons choisi pour nos expériences personnelles. Nous exposerons au préalable quelques types d'appareils employés par d'autres auteurs et nous indiquerons pourquoi nous avons préféré utiliser celui de Mlle CHOUCROUN (78).

CHAPITRE DEUXIÈME

MESURE DE LA CHARGE DES MICROBES DESCRIPTION DES APPAREILS UTILISÉS

Il existe plusieurs méthodes permettant la mesure de la charge des microbes. Nous ne les citerons que pour mémoire, en étudiant plus particulièrement celle que nous avons employée : la méthode d'électrophorèse. Ce sont :

1^o *Les méthodes capillaires :*

2^o *Les méthodes de répartition dans l'espace*, utilisant la répartition statistique des éléments d'une suspension en repos avec l'application de la formule de J. PERRIN ;

3^o *Les méthodes de floculation* où l'on détermine la quantité d'ions de signe contraire nécessaire pour annuler la charge d'une particule ;

4^o *Les méthodes d'électrophorèse* que nous avons employées et dont nous allons parler maintenant.

I. — Méthodes d'électrophorèse.

Quelques phrases extraites d'une note récente de Mlle CHOU-CROUN (79) permettent de donner une définition précise de l'électrophorèse : « On sait que l'électrophorèse consiste dans le transport, le long d'un champ électrique, de particules en suspension dans un liquide ionisant, tel qu'une solution aqueuse. Ce transport révèle l'électrisation de la particule ; le sens du transport en donne le signe, et la vitesse par rapport au liquide en mesure l'importance. » Ces méthodes d'électrophorèse vont donc consister à déterminer la vitesse de transport des corpuscules dans un champ électrique connu. Dans la mise au point de ces techniques, les auteurs ont toujours cherché à supprimer

les phénomènes d'électrolyse; ou mieux, à éviter que les produits provenant de cette électrolyse se mélangent à la suspension bactérienne. Il existe deux sortes de techniques employées pour effectuer les mesures d'électrophorèse :

- 1° Les méthodes macroscopiques;
- 2° Les méthodes microscopiques.

A) MÉTHODES MACROSCOPIQUES :

Les méthodes macroscopiques (1) ne peuvent donner qu'une idée générale du phénomène de transport électrique, parce qu'elles n'en indiquent que le sens; la vitesse de ce transport n'est évaluée dans ces méthodes que d'une manière très approchée et fournit un résultat global, sans s'occuper des valeurs particulières de chaque microbe. En ce qui nous concerne, nous avons préféré utiliser la méthode microscopique parce qu'elle permet de suivre facilement chaque microbe et de mesurer la valeur de sa charge avec précision. Elle permet seule d'établir une statistique sur la répartition des charges électriques d'une émulsion microbienne.

La première réalisation de la méthode macroscopique (2) s'est inspirée des travaux de H. BECHHOLD (22-23) et surtout de ceux de CH. DHÉRE (113 à 116) sur la dialyse électrique. L'appareil de BECHHOLD est constitué par deux cloches fermées par une membrane et réunies par un tube transversal. Chaque cloche plonge dans un récipient rempli d'eau pure et contenant une des électrodes. Ce dispositif permet de ne pas être gêné par les produits d'électrolyse.

DHÉRE emploie *un tube en U renversé* dont il fait plonger les extrémités dans deux vases qui contiennent les électrodes. Il ferme les deux orifices du tube en U par des membranes de collo-

(1) L'étude de l'électrodialyse (qui ne doit pas être confondue avec l'électrophorèse) et les perfectionnements apportés à ses appareils ont sans aucun doute grandement contribué à la réalisation des appareils de transport électrique. Il convient de souligner les travaux systématiques de CH. DHÉRE (113 à 116) qui ont abouti à la réalisation d'un excellent appareil d'électrodialyse qui pourrait fort bien être employé pour l'électrophorèse.

(2) Il convient de rappeler que les premières recherches concernant la migration des colloïdes dans un champ électrique ont été effectuées dans des tubes droits. Mentionnons, en particulier, celles de H. PICTON et S.-E. LINDER (373) en 1892 et celles de W. R. WHITNEY et J. C. BLACKIE (502) en 1904.

dion. Perfectionnant encore son dispositif, cet auteur a réalisé un appareil qui permet la séparation des branches anodique et cathodique, d'où la possibilité d'éliminer les perturbations occasionnés par les produits d'électrolyse.

D'autres perfectionnements lui ont été apportés par TEAGUE et BUXTON (476) puis par MICHAELIS (325). Ce dernier a utilisé les conseils donnés par HARDY (210 à 211) en 1905.

De nombreux auteurs (1) ont tenté d'apporter des perfectionnements à cette technique. Nous nous bornerons ici à donner quelques détails concernant deux des appareils les plus récents : celui utilisé par Ph. LASSEUR (287) et celui utilisé par Mlle CHOU-CROUN (78).

Ph. LASSEUR et R. FRIBOURG (292) voulurent confirmer leurs observations, déterminées au moyen de la technique microscopique (avec utilisation d'une lame-cellule se rapprochant de celle préconisée par Cotton et Mouton), par l'emploi de la méthode macroscopique. Dans ce but, ils utilisèrent l'appareil de KOPACZEWSKI (271) auquel ils apportèrent quelques modifications. Cet appareil permet l'évacuation rapide des produits d'électrolyse aux environs des électrodes. Il est constitué par un tube en U renversé, qui plonge dans un autre tube en U contenant deux électrodes en platine. Chaque branche de ce dernier tube porte une tubulure par laquelle arrive le courant liquide destiné à chasser les produits d'électrolyse formés autour des électrodes. Le tube en U renversé contient la suspension bactérienne à étudier. Il possède, en outre, au sommet de chaque branche, une membrane en verre poreux destinée à empêcher la diffusion du côté opposé de la suspension bactérienne. Par leur nettoyage rapide, ces membranes présentent un grand avantage sur les tampons de gélose précédemment utilisés.

Mlle CHOU-CROUN (78) a également apporté des perfectionnements à la méthode d'électrophorèse macroscopique. De plus, elle a attiré l'attention des expérimentateurs sur la nécessité d'opérer dans des conditions bien définies et de ne pas négliger « les perturbations énormes liées à l'existence même du champ ».

(1) Parmi ces auteurs nous citerons : GALECKI (175), LANDSTEINER et PAULI (282), SVEDBERG (473), TISELIUS (485), MAC INNES et BRIGHTON (318), ELLIS (136), MUKHERJEE (342), GERASSIMOW (184), PAULI et ENGEL (365), DE KRUYT et Van der WILLIGEN (278), TODD (487), P. GIRARD et Mme GUASTALLA (187), KOPACZEWSKI (271), RABINOWITSCH et FODIMAN (385), VLES (494 bis), NORTHROP et CULLEN (359 bis), HUMPHREY (243 bis), HOEBER (232).

Il faut tenir compte, en effet, du mouvement propre du liquide, provoqué par le phénomène de l'osmose électrique. Comme nous l'avons vu au début de ce chapitre, ce phénomène provient de l'électrisation par contact de la paroi, aux dépens des ions du milieu qui baignent cette paroi. La couche double ainsi formée a son feuillet mobile qui glisse le long de la paroi, et entraîne tout le liquide ambiant, lorsqu'on établit le champ électrique. Ce mouvement propre du liquide est d'ailleurs constitué par la somme algébrique du mouvement dû à l'osmose électrique seule et du reflux liquide provoqué par la résistance à l'entraînement du feuillet mobile. Il existera donc dans le tube des gaines liquides dont le mouvement aura une origine différente suivant leur éloignement de la paroi. Près de la paroi, l'entraînement dû à l'osmose électrique prédomine; il s'atténue par suite du reflux liquide venant en sens inverse, au fur et à mesure qu'on se rapproche du centre du tube pour donner une « zone neutre de vitesse nulle » située à peu près aux deux tiers du rayon du tube. Au centre de ce dernier, la gaine liquide est entraînée dans le sens du reflux.

Nous comprenons donc aisément que si ce liquide contient des corpuscules ou des bactéries électriquement chargés en suspension, ce « double brassage » (dû à l'osmose et au reflux) « pourra masquer l'action directe du champ en ramenant sans cesse des particules vers l'électrode qui les chasse ». Par conséquent, et ceci est très important, une particule chargée ne se meut pas avec une vitesse dépendant uniquement de sa charge.

Mlle Choucroun a ensuite attiré l'attention sur une autre cause de perturbation apportée par *l'électrolyse inévitable* du milieu qui libère des ions allant modifier la charge ou même le signe des particules en suspension. Si l'on peut empêcher les particules d'atteindre les électrodes en les arrêtant par des membranes imperméables (collodion, cellophane, etc.), on ne peut, par contre, empêcher les ions H^+ et OH^- d'arriver dans le liquide étudié. Pour cet auteur, l'élimination de ces ions par un courant liquide de grand débit ne se montre pas suffisamment efficace, et il est préférable de réaliser des champs faibles au voisinage des électrodes. Ceci a été obtenu en « plongeant les électrodes dans un milieu très conducteur par rapport au liquide soumis à l'électrophorèse ». Mlle Choucroun a donc réalisé le

dispositif suivant que nous allons décrire en rapportant ses propres termes :

« Un tube en U, fermé aux deux bouts par une membrane « de cellophane et divisé en trois parties assemblées par des « rôdages plans (compartiments anodique, cathodique et com-
« partiment médian), contiendra le liquide à étudier. Les deux « extrémités de ce tube en U plongent dans le même liquide, ou « dans un liquide salin de même conductibilité. Ce liquide repose « sur un tampon de gélatine imprégné de K Cl normal; l'autre « extrémité du tampon est baignée par du K Cl normal dans « lequel plonge l'électrode. Alors, la presque totalité du champ « se concentre dans la région qui nous intéresse. Et, dans le « champ très faible réalisé près des électrodes, la progression des « ions H^+ et OH^- devient si faible qu'ils n'ont pas le temps, « pendant la durée de l'expérience, d'arriver jusqu'à l'intérieur « du tube. » Dans de telles conditions il n'y a plus de modifications notables de pH.

Mlle Choucroun cherche enfin à éliminer une dernière perturbation, constituée par l'apparition d'ions H^+ et OH^- au voisinage des membranes. Ceci semble indiquer « qu'une membrane traversée par un courant peut fonctionner comme une électrode secondaire ». L'addition, dans le milieu, de part et d'autre de la membrane, d'une solution tampon de même pH que le milieu étudié, neutralisera ces ions H^+ et OH^- et supprimera ainsi cette cause d'erreur.

Avec cet appareil, Mlle CHOUCROUN et HARRY PLOTZ (80) éclaircissent notamment la question concernant la filtrabilité du bacille tuberculeux. Faisant l'électrophorèse de filtrats tuberculeux, afin de les concentrer, ces auteurs purent y déceler parfois la présence de bacilles de Koch. Cela montra qu'un certain nombre de ces bacilles peuvent passer à travers le filtre Chamberland L 2. Les mêmes auteurs pensèrent qu'il faut attribuer plutôt à ces bacilles ainsi filtrés, la maladie bénigne provoquée chez le cobaye à la suite de l'inoculation du filtrat, qu'à un virus filtrant tuberculeux, comme on le faisait autrefois.

Un tel appareil peut donc être employé, non seulement dans l'étude de l'électrophorèse des milieux biologiques, mais encore pour :

1^o Concentrer des colloïdes sans les altérer et y découvrir de ce fait certains éléments qui auraient pu passer inaperçus;

2° Dans une suspension, séparer l'une de l'autre deux particules inégalement chargées;

3° Etre d'une grande utilité dans l'étude de certains milieux biologiques.

P. GIRARD et Mme L. GUASTALLA (187) ont également attiré l'attention sur l'influence de l'osmose électrique et de la variation de pH du milieu dans les expériences d'électrophorèse des milieux biologiques. Ces chercheurs ont fait des remarques semblables à celles émises par Mlle Choucroun concernant les modifications physico-chimiques apportées par ces deux phénomènes sur le transport électrique des particules ou des microbes. Enfin, plus récemment, en 1935, mentionnons que H. THEORELL (477) a conçu un appareil de mesure qui peut être utilisé aussi bien pour les mesures précises d'électrophorèse que pour les recherches analytiques.

B) MÉTHODES MICROSCOPIQUES.

Comme pour les méthodes macroscopiques, il a été proposé de nombreux types d'appareils plus ou moins perfectionnés. Nous avons cherché à employer l'appareil donnant les mesures les plus précises, et qui par son dispositif permet de ne pas être gêné par les phénomènes d'électrolyse.

Nous allons faire la description de quelques appareils de mesure microscopique qui ont été utilisés par certains auteurs pour l'étude de l'électrophorèse. Nous indiquerons ensuite lequel de ces appareils nous avons employé et pour quelles raisons nous avons fait ce choix.

1° *Appareil employé par Ph. Lasseur.*

Cet auteur a utilisé un dispositif analogue à celui employé par Cotton et Mouton. En voici la description selon Ph. LASSEUR (287) : « Des bandes de feuille d'étain sont fixées sur des « lames porte-objet nettoyées avec soin. Les bandes très unies « mesurent 10 millimètres de large. L'adhérence au verre est « assurée au moyen d'une goutte d'eau. On dépose la bande « d'étain à la surface de la goutte; et, à l'aide de papier-filtre, « on enlève l'excès d'eau tout en maintenant la bande appliquée « au verre. Par dessiccation, la bande adhère parfaitement au « verre. Deux bandes de mica permettent de donner à la prépa-

« ration une épaisseur convenable. Ces bandes sont mises en
« place avec une goutte de baume du Canada, ou plus simple-
« ment avec une goutte du liquide dispersif. Dans la chambre
« délimitée par les deux cales de mica, on introduit une quan-
« tité convenable de suspension microbienne. On recouvre la
« couche liquide à l'aide d'un couvre-objet rigoureusement
« propre. » La distance des électrodes est de 15 millimètres, la
force électromotrice de 12 ou 16 volts, suivant les espèces micro-
biennes considérées.

Ph. Lasseur précise ensuite les conditions d'expériences : il faut éviter les courants de convection et de diffusion, les changements de température (d'où l'emploi de courants de faible intensité), les trépidations qui impriment des secousses à la couche liquide; en outre, la préparation doit être exempte de bulles d'air, elle doit présenter une épaisseur suffisante pour que l'examen ne porte que sur la couche médiane. Le liquide d'émulsion doit être de l'eau distillée, ou un liquide très pauvre en électrolytes, car tout examen est rendu impossible par l'électrolyse qui produit des bulles gazeuses s'opposant au déplacement des microbes et par des produits d'hydrolyse agglutinant ces germes. Ph. Lasseur a perfectionné cette technique en collant les bandes de papier d'étain et les lamelles de mica avec du baume du Canada.

En 1932, de nouveaux perfectionnements le conduisirent à l'appareil suivant : une lame de verre épais mesurant 130mm × 35 mm. porte une chambre dont la profondeur varie de 0,15 mm. à 0,45 mm. suivant les lames. Dans cette chambre, on dépose l'émulsion à étudier. Les électrodes sont constituées par des lames d'argent doré d'épaisseur convenable, sur lesquelles sont soudées les bornes reliées à la source de courant. WALTER KROSS et M. ZUELZER (276) dans leur étude sur l'électrophorèse des Spirochètes ont employé une cellule se rapprochant beaucoup de celle employée par Ph. LASSEUR, ainsi que R. SEIGNEURIN dans ses recherches sur l'électrophorèse de différentes suspensions microbiennes.

2^o *Appareil employé par I. S. Falk, L. B. Jensen et J. H. Mills.*

Après diverses modifications destinées à éviter la polarisation et l'électrolyse, FALK (151) utilisa l'appareil suivant pour déter-

miner la virulence de nombreux bacilles diphtériques. Des lamelles de verre sont taillées aux dimensions désirées et collées sur une lame de verre épaisse. Elles forment ainsi une cellule rectangulaire dans laquelle sont ménagées des encoches permettant le passage d'électrodes de platine.

La cellule bien nettoyée est remplie avec de la suspension bactérienne trois fois lavée et provenant de bouillon de culture âgé de 48 heures. Une grande lame de verre est ajustée étroitement sur la cellule et l'excès d'eau est enlevé avec du buvard. La cellule est montée sur un microscope et reliée à une source de courant continu (batterie de piles sèches de 45 volts). Après chaque mesure, FALK recommande d'inverser le courant. Cette cellule a été employée notamment par DOZOIS, TITSLER, LISSE et DAVEY (122), pour étudier l'action des rayons X sur la vitesse de migration électrophorétique de souches d'*Escherichia coli*.

Nous mentionnerons encore que FALK a cherché à simplifier davantage sa technique en y combinant la « méthode du tube capillaire ».

Nous serions incomplet si nous omettions de signaler la cellule de J.-H. NORTHROP (358), en 1922, qui a été employée par de nombreux auteurs, notamment par C.-E.-A. WINSLOW, I.-S. FALK et M.-F. CAULFIELD (511) qui lui ont apporté quelques modifications suggérées par J. LÆB, en particulier, l'emploi d'électrodes (zinc-sulfate de zinc) contenues dans une paire de petits canaux reliés à la cuve et munis d'un robinet de sûreté et par R.-L. TITSLER et M. W. LISSE (486), en 1928, dans leur étude sur les rapports entre la charge électrique et la capacité d'agglutination de *Salmonella pullorum*.

Inconvénients de ces appareils. — Le grand inconvénient de ces lames-cellules provient du fait que *les électrodes plongent directement dans la suspension microbienne* : il s'ensuit que les produits d'électrolyse formés se mélangent à l'émulsion observée. De plus, il se forme au cours de cette électrolyse inévitable des bulles de gaz qui produisent des remous dans la masse liquide. Il est facile de déduire que les modifications de pH provoquées par la présence de ces produits d'électrolyse et que le brassage liquide dû aux gaz se dégageant dans la suspension, modifieront la mobilité et la vitesse des germes étudiés. Il ne nous semble pas que l'inversion fréquente du courant puisse atténuer beaucoup les causes d'erreurs ainsi apportées.

3^o Appareil utilisé par Mlle Choucroun.

De plus, ces cellules ne réalisant pas des systèmes hermétiquement clos, ceux-ci favorisent les entraînements partiels de la suspension étudiée. Aussi allons-nous décrire en détail l'appareil mis au point par Mlle Choucroun, appareil qui permet de parer à tous ces inconvénients.

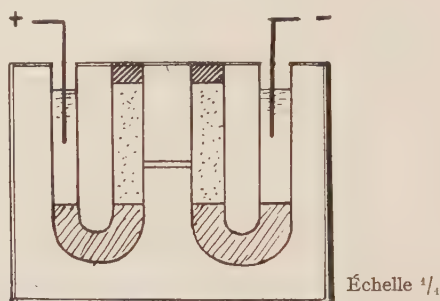
C'est celui que nous avons utilisé. Il nous semble que c'est l'appareil qui est actuellement le plus perfectionné et qui permet d'obtenir des mesures précises et régulières, *même si celles-ci ont une longue durée*. Les ions produits au voisinage des électrodes progressent très lentement dans le champ faible et, par cela même, la précision des mesures en est très augmentée.

Ce dispositif est en quelque sorte la réalisation en miniature de deux tubes en U de Bechhold (employés pour les déterminations macroscopiques par cet auteur), reliés par une fine rainure. L'introduction, dans le fond de chacun des tubes ainsi reliés, d'un tampon de gélatine, permet de faire plonger les électrodes dans un liquide autre que la suspension microbienne.

a) Description de l'appareil :

Cet appareil à électrophorèse microscopique est constitué par une « cuve plate creusée dans une glace plane d'environ 4 cm. de côté et formée par deux rigoles en U d'environ 10 mm³ de section réunies par une rainure plate de 1 cm. de longueur, 1 mm. de largeur et 100 microns de profondeur. » Cette cuve est recouverte intégralement par une lamelle qui adhère parfaitement. L'isolement des électrodes et, par suite, l'invariabilité du milieu d'observation est résolue en remplissant la partie inférieure de chaque tube en U par de la gélatine conductrice. Chaque tube en U est donc constitué par la suite de milieux suivants : une solution conductrice dans laquelle plonge l'électrode, un tampon de gélatine conductrice ; puis, dans la branche de l'U communiquant par la rainure à la branche interne de l'autre tube en U, est introduite l'émulsion microbienne à étudier ; enfin un nouveau tampon de gélatine et la solution conductrice dans laquelle plonge l'autre électrode terminent cette succession de milieux. A propos de cet appareil, Mlle Choucroun écrit : « A cause de la grande conductibilité ainsi réalisée jusqu'à

« l'émulsion soumise à l'électrophorèse, et à cause de la faible section de la rainure que vise le microscope, le voltage est pratiquement concentré dans cette rainure qui, de plus, ne peut être atteinte pendant la faible durée nécessaire à l'observation par les ions formés aux électrodes. » Voici le schéma de cet appareil qui permettra de mieux comprendre sa description.



Appareil d'électrophorèse pour observations microscopiques
imaginé par M^{lle} Choucroun.

b) *Technique à suivre pour l'emploi de cette cuve.*

1^o *Nettoyage de la cuve.*

Cette première opération est très importante et doit être effectuée très méticuleusement. La cuve ayant servi à une expérience antérieure est plongée d'abord un certain temps dans le formol, afin de tuer tous les germes. A cette opération préliminaire succède toute une série de lavages : on lave tout d'abord au xylol, pour dissoudre la paraffine qui a permis l'adhérence de la lamelle sur la cuve, puis on lave à l'alcool, à l'eau ordinaire, et enfin on termine par un long lavage à l'eau distillée. Enfin, on sèche la cuve en l'essuyant soigneusement avec du papier Joseph.

2^o *Fixation de la lamelle couvre-objet.*

Quand la cuve est bien sèche, on la chauffe en lui faisant subir un mouvement de va-et-vient sur un bloc de quartz qui a été au préalable fortement chauffé. A l'aide d'un pinceau à poils très courts, on passe sur la surface de la cuve une légère

couche de paraffine fondue; cette couche doit être faible et aussi homogène que possible. Une telle manipulation est très délicate : il faut, en effet, éviter que la paraffine coule dans la rainure centrale et obstrue celle-ci. A l'aide de papier-filtre, on enlève l'excès de paraffine là où on le juge nécessaire; puis on applique la lamelle en faisant en sorte qu'elle adhère parfaitement et partout, particulièrement aux abords de la rainure centrale.

3° *Remplissage de la cuve.*

Par les deux rainures extérieures de chaque tube en U, on introduit à l'aide d'une pipette Pasteur un mélange de gélatine et de solution normale de chlorure de potassium. Cette gélatine préalablement liquéfiée et ainsi introduite constitue après refroidissement un tampon solide dans le fond de chaque tube en U. On laisse donc cette gélatine se solidifier, puis on introduit avec une pipette Pasteur l'émulsion microbienne dans l'un des deux tubes de l'U communiquant par la rainure centrale. On ferme alors ces deux tubes au moyen de quelques gouttes de paraffine en évitant d'emprisonner des bulles d'air. Le système gélose-émulsion microbienne est donc parfaitement clos et, si le montage est fait très soigneusement, il ne devra y avoir à l'intérieur de la cuve aucun courant liquide dont la présence puisse rendre les mesures fausses. Il suffit alors de mettre de la solution normale de chlorure de potassium dans les deux tubes externes de l'U, et d'y faire baigner les électrodes pour que la continuité conductrice soit assurée. La cuve est ainsi prête à être examinée.

4° *Examen de la cuve.*

La cuve, placée dans un dispositif spécial, sera mise sur la platine d'un microscope binoculaire. L'examen est fait avec un fort objectif à sec. Dans l'un des oculaires se trouve gravé un quadrillage constitué par 10 carrés sur 10 carrés.

La mesure de la vitesse de transport s'effectue au moyen d'un chronomètre indiquant le $1/10^e$ de seconde et qu'on déclenche chaque fois qu'un microbe entre dans la zone quadrillée. La mesure est prise pour un parcours de 5 ou 10 carrés suivant la vitesse des microbes examinés.

5° *Mise au point.*

La mise au point est également très délicate et peut être la cause de beaucoup d'erreurs, si elle n'est pas effectuée dans des

conditions bien définies. Elle doit se faire très graduellement. On la fait d'abord sur la paraffine de la lamelle, ou sur un léger trait de couleur rouge ou bleu, que l'on a tracé au préalable au milieu de la face interne de cette lamelle. Puis abaissant très lentement l'objectif au moyen de la vis micrométrique, on arrive sur une couche de l'émulsion microbienne.

Sur quelle couche, à quel niveau de cette émulsion devra-t-on faire la mesure du transport électrique?

Si, le courant étant établi, nous mettons au point dans la partie supérieure de la préparation, nous voyons les microbes se diriger vers la cathode; si nous mettons au point de plus en plus bas, nous constatons que la vitesse avec laquelle les germes se dirigent vers la cathode devient de plus en plus faible, pour s'annuler à un certain moment; dans cette partie de la préparation, les microbes ne se dirigent pas plus dans un sens que dans l'autre; ils sont seulement animés de leur mouvement brownien. Lorsque nous arrivons au milieu de la cuve, les microbes changent de sens, se dirigent vers l'anode avec une vitesse croissante qui est maximum au milieu de la cuve. Si nous continuons à abaisser l'objectif, tous les phénomènes que nous venons de voir vont se dérouler en sens inverse: c'est-à-dire que la vitesse vers l'anode diminue, s'annule, et vers le fond de la cuve le transport s'effectue de nouveau en sens inverse, vers la cathode, comme pour les microbes situés dans la partie supérieure de la préparation. La préparation comprendra donc plusieurs zones: une zone supérieure et une zone inférieure où les bactéries se dirigent vers la cathode, une zone médiane où les germes vont vers l'anode, et ces zones extrêmes sont séparées de la zone médiane par une gaine où les germes ont un sens indifférent.

Explication de ce phénomène:

Pourquoi les microbes se dirigent-ils vers un pôle dans la partie supérieure et inférieure de la préparation et vers un autre pôle dans la partie médiane de la préparation?

Les explications données par Mlle Choucroun, concernant le sens des divers courants liquides observés dans l'électrophorèse macroscopique, sont valables ici. Mlle Choucroun a dit

elle-même en terminant sa note concernant la mise au point de son appareil de mesure macroscopique : « Enfin, une discussion analogue m'a permis d'améliorer les dispositifs employés pour la détermination de l'osmose électrique et pour l'observation microscopique de l'électrophorèse. » (Nous avons rappelé cette discussion lorsque nous avons exposé les méthodes macroscopiques).

La vitesse d'un point du liquide a été calculé par Mlle Choucroun, qui a trouvé l'expression parabolique

$$v_{\omega} \left(3/2 \left(\frac{a^2 - x^2}{a^2} \right) - 1 \right)$$

où x désigne la distance d'un point au plan médian et $2a$ l'épaisseur de la rainure. « Cette vitesse varie donc depuis v_{ω} contre la paroi jusqu'à $-\frac{v_{\omega}}{2}$ sur le plan médian, en s'annulant sur les plans situés de part et d'autre du plan médian à la distance $a/\sqrt{3} -$ ».

D'après ce que nous venons d'expliquer, il faudra mettre au point sur les plans situés à la distance $a/\sqrt{3}$ du plan médian pour avoir le véritable sens du transport électrique et la vitesse propre des bactéries.

6° Détermination de la charge électrique.

La mise au point étant effectuée, on établit le passage du courant (en général 45 volts fournis par une batterie de piles sèches) et on note le temps nécessaire au transport d'un microbe sur une longueur représentée par 10 carrés. Dans le but d'avoir des résultats aussi précis que possible, on procède à un grand nombre de mesures. On fait ainsi une statistique comportant 50 ou 100 déterminations pour la même émulsion (en général 50 mesures sont suffisantes). Ces mesures sont faites sur des microbes pris au hasard à n'importe quelle partie du champ microscopique, pourvu naturellement que le bacille passe dans la direction du champ et dans la zone quadrillée. Toutes les 10 mesures, on inverse le sens du courant, cela pour annuler le

peu d'électrolyse qu'il pourrait y avoir. Avec ces 50 déterminations, on construit une courbe dite *courbe intégrale*. Cette courbe est obtenue en portant en abscisse les vitesses observées, et en ordonnée le nombre total de bacilles qui possèdent une vitesse de transport supérieure à la vitesse considérée. On trace la courbe en commençant par les plus grandes vitesses. On a ainsi une courbe en escalier, donnant l'allure de la répartition des charges ; sa *courbe dérivée*, appelée *courbe de répartition des bacilles selon leur vitesse*, caractérise l'émulsion. « La position de cette courbe sur l'axe, sa largeur et sa hauteur en sont, comme pour une bande d'absorption dans un spectre, les caractères importants (Mlle Choucroun). » L'abscisse de l'ordonnée maxima de la courbe dérivée peut servir à caractériser l'émulsion d'une manière approchée.

CHAPITRE TROISIÈME

Expériences personnelles.

C'est avec la méthode d'expérimentation que nous venons de décrire que nous avons effectué nos recherches et tenté de vérifier nos hypothèses.

I. — Les charges électriques des microbes varient-elles au cours de la multiplication microbienne normale comme varie la courbe qui traduit cette multiplication ?

Nous avons suivi parallèlement, d'une part, *la poussée* du bacille pyocyanique en faisant des dénombrements à des intervalles bien déterminés, et d'autre part *la valeur des charges électriques* de ce bacille en mesurant cette valeur au moment de chaque prise d'essai. Pour dénombrer les microbes, nous avons employé la méthode de numération des colonies développées sur plaques de gélose; et, pour mesurer la valeur des charges électriques, nous nous sommes servi de la méthode d'électrophorèse microscopique en utilisant la cuve mise au point par Mlle CHOUROUN.

Nous ne reviendrons ni sur la technique de numération choisie par nous, l'ayant déjà expliquée au premier chapitre, ni sur la méthode d'électrophorèse dont nous venons de parler.

Nos expériences ont été faites avec l'eau peptonée dialysée, dont nous avons indiqué la préparation dans la première partie. Les résultats trouvés nous ont montré que ce milieu, quoique pauvre, convenait encore très bien à la multiplication du bacille pyocyanique. Il nous a semblé, en outre, que ce milieu de culture, grâce à sa grande pauvreté en sels, devait se prêter parfaitement à des mesures d'électrophorèse. A ce sujet, signalons qu'il est préférable d'étudier la charge des microbes dans leur propre milieu de culture et avec leur ambiance que de les changer

de milieu, soit en les diluant dans un milieu différent de celui où ils se sont développés, soit de les centrifuger, de les laver et de les remettre en suspension comme l'ont fait certains auteurs. Ces manipulations sont nuisibles, car elles ne peuvent que modifier et altérer l'état électrique des parois de ces germes.

Aussi, lorsque nos suspensions étaient trop concentrées pour permettre des mesures précises, avons-nous toujours dilué nos cultures avec *le même milieu* que celui dans lequel les microbes s'étaient développés (eau peptonée dialysée).

Au début de nos expériences, nous sommes toujours partis d'un milieu de culture contenant un nombre déterminé de microbes : nous avons pensé prendre le chiffre de 500.000 germes par cm^3 comme pour toutes nos expériences précédentes. Malheureusement les mesures d'électrophorèse se sont montrées trop difficiles et trop pénibles avec un nombre aussi restreint de germes. Aussi avons-nous employé des émulsions titrant au départ, de 100 à 200 millions de germes visibles par centimètre-cube. Ces cultures sont préparées par émulsion directe, dans l'eau peptonée dialysée, de bacilles pyocyaniques provenant d'une souche de 12 heures. On agite vivement l'émulsion afin de la rendre bien homogène et d'éviter la présence d'amas microbiens. Nous nous sommes assurés que les cultures contenaient toujours à peu près la même quantité de germes à l'heure zéro, en faisant une numération au moyen de la méthode de WRIGHT-FRIES (méthode exposée au premier chapitre). Avant de mettre cette culture à l'étuve, nous avons toujours effectué deux prélèvements, l'un pour la détermination du nombre de bacilles pouvant se reproduire sur gélose, l'autre pour la mesure de la charge électrique de ces bacilles. La culture était mise à l'étuve et des prélèvements effectués au bout de : 3 h., 6 h., 9 h., 24 h., 48 h., 3 jours, 8 jours, 15 jours. Comme pour l'heure zéro, nous avons fait chaque fois deux prélèvements destinés, l'un au dénombrement des microbes et l'autre à la mesure de la charge. En outre, nous avons fait des prélèvements après 3 semaines et un mois d'étuve, uniquement pour mesurer la valeur des charges électriques, et voir si celles-ci subissaient des variations appréciables au bout de ce laps de temps.

Voici les résultats numériques d'une expérience pour laquelle le champ était de 20 volts-centimètre. Nous donnons les temps en secondes mis par 50 germes différents pour parcourir 5 divi-

sions du quadrillage. Ces temps (T) sont groupés ci-dessous par ordre de vitesse décroissante et à côté de chacun d'eux est indiqué le nombre de germes (N) qui possèdent cette vitesse parmi les 50 bactéries observées.

T	N	T	N	T	N
0,8	1	1,7	8	2,7	3
1,1	2	1,8	3	2,8	2
1,2	5	1,9	2	3	1
1,3	1	2	3	3,3	1
1,4	4	2,2	3	4,3	1
1,5	4	2,3	1		
1,6	1	2,4	4		

Avec ces chiffres on construit *la courbe intégrale* en portant T en abscisse et N en ordonnée. On a ainsi une courbe en escalier dont nous donnons la figure. Nous en donnons également la courbe dérivée ou courbe de répartition des bacilles selon leur vitesse.

Nous donnerons les résultats d'une seule expérience prise parmi celles que nous avons effectuées, toutes les autres ayant donné des résultats analogues :

Expérience.

A l'heure 0 : 210 millions de microbes par cm^3 (microbes visibles).

Heure	Nombre de microbes par cm^3 (microbes visibles)	Temps (en secondes)	Vitesse en $\mu/\text{sec}/\text{v.}/\text{cm.}$
0	129.300.000	1,8	0,616
3	134.300.000	1,8	0,616
6	356.000.000	1,7	0,653
9	996.000.000	2,1	0,528
24	2.260.000.000	1,7	0,653
48	1.800.000.000	1,9	0,584
72	830.000.000	1,7	0,653
8 jours	239.000.000	0,7	1,59
15 jours	433.000	0,7	1,59
3 semaines		0,7	1.59

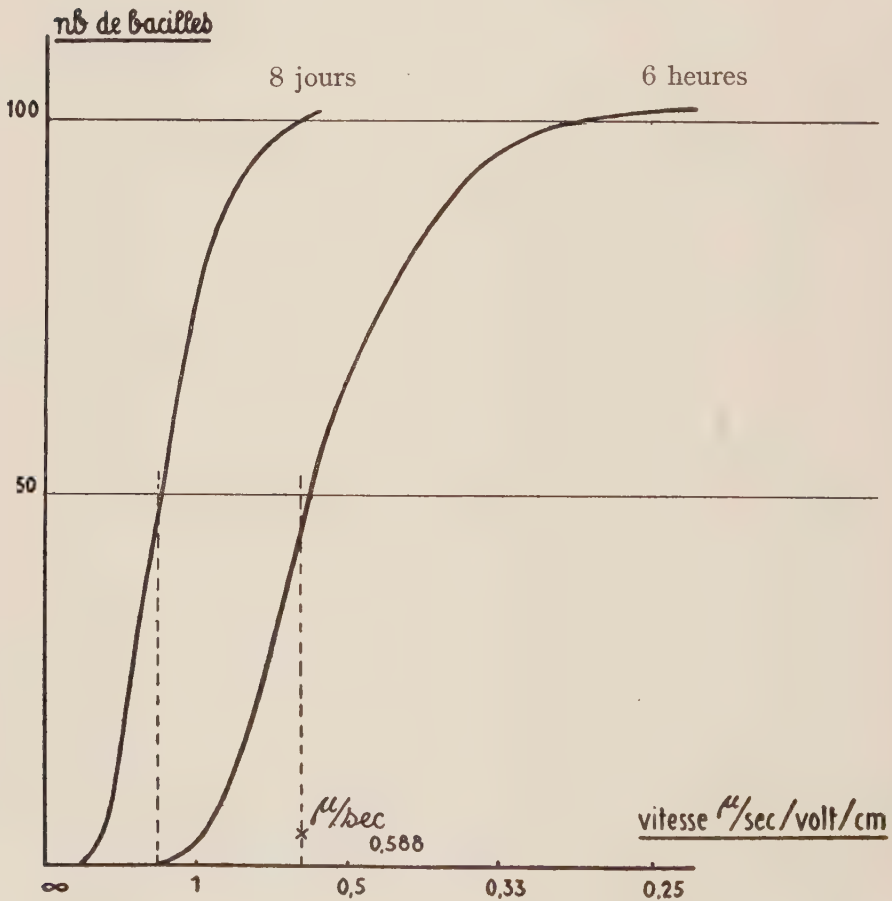
Remarques: 1° Jusqu'à 8 jours, la charge est sensiblement constante;

2° A partir du 8^e jour, les microbes sont nettement plus chargés, ils se montrent beaucoup plus rapides.

Afin que les mesures soient possibles, il a fallu diminuer le voltage de moitié (22,5 volts au lieu de 45 volts).

Nous donnons ci-contre les courbes correspondant à cette expérience : une courbe de l'heure 6 et une courbe du 8^e jour.

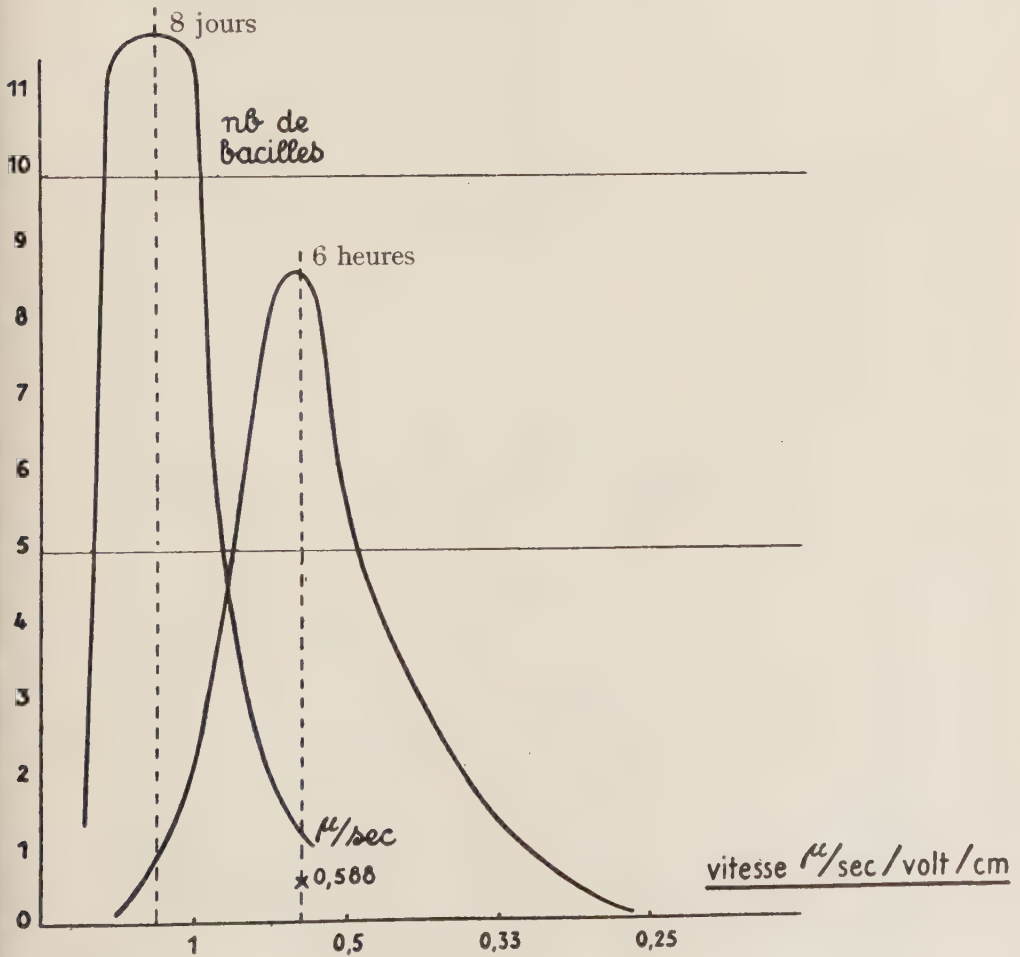
Nous avons eu la surprise de constater que la charge conserve sensiblement la même valeur, même lorsque la puissance de



multiplication des bacilles est devenue très faible. C'est seulement au bout de 8 jours que l'électrisation se trouve être modifiée.

Il semble rationnel de penser que cette variation si tardive doit être produite par la présence en quantité suffisante dans le milieu, de substances actives vis-à-vis de la charge (toxines ou substances de déchet provenant du métabolisme microbien).

Dans les autres expériences, nous avons toujours trouvé des résultats analogues, c'est-à-dire le maintien de la charge à une valeur sensiblement constante pendant 8 jours.



Incidemment, nous avons fait quelques expériences afin de voir si la concentration en microbes a une influence sur la valeur des charges électriques. Pour cela, nous avons mesuré la charge des bactéries d'une émulsion; aussitôt après, faisant une dilution au dixième, nous avons effectué une nouvelle mesure de charge. Celle-ci nous a donné des résultats identiques. Plusieurs expériences effectuées dans le même but ont toujours fourni les mêmes résultats.

Cela est très important à connaître, quand on suit la valeur de la charge pendant la multiplication microbienne. En effet, si la concentration en bactéries avait une influence sur la charge, il faudrait en tenir compte dans l'interprétation des résultats. De plus, sachant que la concentration en bactéries n'a aucune influence appréciable sur la valeur des charges, nous avons pu diluer librement l'émulsion lorsque celle-ci devenait trop concentrée pour permettre des mesures précises, sans craindre d'apporter une cause d'erreur avec cette dilution. Il est nécessaire de diluer les cultures au 1/10 à partir de 48 heures. A ce propos, signalons ici que les résultats de R. SEIGNEURIN ne sont pas conformes à nos conclusions. En effet, nous rappelons que cet auteur a trouvé que la concentration en germes d'une émulsion exerce une influence sur la valeur de l'électrisation de ceux-ci.

II. — L'action excitante ou inhibitrice du nitrate de lanthane est-elle en relation avec une variation de l'électrisation ?

Nous avons recherché si l'addition de nitrate de lanthane aux concentrations où ce sel agit sur la vitesse de multiplication des bacilles pyocyaniques est accompagnée d'une variation de l'électrisation de ces bacilles.

Nous avons d'abord pensé mesurer la charge à la 8^e heure, qui est l'heure de vitalité maximum du microbe. Or, pour les concentrations étudiées M/200.000, M/30.000, M/3.000, nous n'avons observé aucune différence de la charge par rapport à l'émulsion-témoin : les *courbes statistiques* d'électrisation sont en effet superposables avec celle du témoin. Ceci veut dire que les bacilles contenus dans les prélèvements faits à l'heure 8 ont, *en ce qui regarde l'électrisation*, les mêmes propriétés dans les émulsions au lanthane que dans l'émulsion-témoin.

Il est en effet possible de faire le raisonnement suivant : nous avons vu qu'une émulsion microbienne est constituée par un certain nombre de populations. Quand nous ajouterons le nitrate de lanthane, il se peut que certaines de ces populations subissent des variations de charge plus appréciables. Les germes ainsi touchés par le lanthane formeront une certaine proportion de la suspension. Si nous faisons immédiatement la répartition statistique de l'émulsion, nous pourrions saisir ces variations par le fait qu'il passera dans le champ de notre microscope un certain nombre de ces bacilles.

Mais il s'écoule un temps assez long entre l'addition du lanthane et la mesure de la charge ; il peut se faire que les populations touchées électivement par le lanthane se multiplient beaucoup plus lentement que les autres ou pas du tout. Leur proportion relative dans l'émulsion diminuera donc au fur et à mesure de la multiplication normale des populations non atteintes par le lanthane. C'est ainsi que la véritable action du lanthane ou de tout autre sel pourra être masquée si l'examen est fait trop tardivement.

Et ce raisonnement suffit à expliquer que pour les doses inhibitrices, l'heure tardive 8 soit mal choisie. En ce qui regarde les doses exaltantes, il faudrait supposer s'il y a une action du lanthane sur l'électrisation du bacille, qu'elle soit extrêmement faible et non décelable par nos méthodes. En tous cas, on pourra mieux saisir cette action du lanthane sur l'électrisation des bacilles en faisant des déterminations *aussitôt* après l'addition de nitrate de lanthane.

Explication d'une expérience :

Dans des tubes pyrex contenant de l'eau peptonée dialysée et du nitrate de lanthane en quantités définies, on émulsionne du bacille pyocyanique provenant d'une souche sur gélose âgée de 12 heures. On agite soigneusement cette émulsion qui est faite de telle sorte qu'elle contienne toujours approximativement la même quantité de bacilles. D'ailleurs ici, il n'est pas nécessaire de partir toujours d'un nombre rigoureusement identique, puisque, nous l'avons vu, la concentration en germes n'a aucune influence sur la valeur de la charge électrique. D'autre part, on prépare la cuve à électrophorèse suivant la technique que nous

avons exposée plus haut en détail. Nous avons toujours commencé les mesures après *un quart d'heure de contact* entre les bactéries et le nitrate de lanthane. En effet, l'observation ne peut pas être faite immédiatement, par suite de l'introduction de l'émulsion dans la cuve, de la fermeture de celle-ci à la paraffine, de la recherche et de la mise au point de la zone liquide permettant les mesures les plus exactes. Le temps de contact que nous avons choisi, *soit 15 minutes*, permet d'effectuer toutes ces manipulations. Il suffit alors de mesurer les vitesses de transport comme nous l'avons indiqué précédemment.

Voici les résultats trouvés :

1^o *Concentration M /200.000 :*

Il n'y a aucune différence de la valeur des charges entre la culture-témoin et la culture contenant le nitrate de lanthane à cette concentration.

Tous les bacilles se dirigent vers l'anode.

2^o *Concentration M /30.000 :*

Cette concentration exalte la multiplication du bacille pyocyanique. En ce qui concerne les charges, nos expériences ne montrent pas une différence sensible avec les charges des cultures-témoins.

Tous les germes se dirigent vers l'anode.

3^o *Concentration M /3.000 :*

C'est une concentration indifférente vis-à-vis de la poussée des bacilles étudiés. Les microbes n'accusent pas un transport sensiblement plus lent que celui des bacilles-témoins et que celui des bacilles ayant poussé sur des milieux dans lesquels la concentration du nitrate de lanthane est de M /30.000.

Les bacilles sont tous porteurs d'une charge négative.

4^o *Concentration M /1.000 :*

C'est une concentration plutôt défavorable pour la multiplication du bacille pyocyanique. Placés dans un champ électrique, les bacilles migrent beaucoup plus lentement vers l'anode

que les bacilles-témoins et les bacilles s'étant développés sur des concentrations en sel de lanthane telles que $M/30.000$ et $M/3.000$. Mais, comme nous l'avons déjà exposé, une grande partie des germes est tuée ou altérée; c'est sans doute pour cette raison que les charges sont modifiées.

Ces microbes se dirigent encore tous vers l'anode.

5° Concentration $M/500$:

A cette concentration qui est nettement défavorable pour la poussée du bacille pyocyanique, correspond également un transport très lent dans le champ électrique, de valeur analogue à celle de la concentration $M/1.000$. La même remarque faite ci-dessus convient également ici.

A cette concentration déjà forte, les bacilles portent encore tous une charge négative.

6° Concentration $M/100$:

A cette concentration toxique, toute mesure précise est impossible; les germes, en effet, s'agglutinent très rapidement. Mais, phénomène très intéressant, *la charge des microbes est inversée*: ils se dirigent vers la cathode, ils sont donc chargés positivement.

Le lanthane, qui était sans action sur les bacilles vivants, agit maintenant comme sur une paroi inerte en inversant le signe négatif du bacille.

Aussi, nous pouvons conclure que l'électrisation des bacilles ne s'est pas modifiée par l'addition de nitrate de lanthane aux doses exaltantes, ni aux doses indifférentes.

Ce n'est qu'aux doses inhibitrices, entraînant la mort d'une proportion notable des bacilles, que la statistique indique la présence dans le milieu de germes moins chargés, sans doute par action du nitrate de lanthane sur les germes déjà tués ou altérés.

Ceci confirme cette propriété fondamentale, signalée par Mlle Choucroun, qu'a la matière vivante de défendre sa charge.

CONCLUSIONS DE LA TROISIÈME PARTIE

1° La vitesse du transport électrique des bactéries ne varie pas, elle est indépendante de la concentration en germes des émulsions. Nos observations sur ce point sont donc en accord avec celles de certains auteurs. (Ph. LASSEUR en particulier).

2° La charge des bacilles reste sensiblement la même pendant toutes les phases caractéristiques de la poussée : phase de latence, phase logarithmique, phase de multiplication ralentie, phase de maximum stationnaire et même pendant une certaine partie de la phase de déclin. *A partir de 8 jours seulement*, les microbes se montrent beaucoup plus chargés, et manifestent une vitesse beaucoup plus grande dans le champ électrique. On peut penser que les modifications de la charge sont alors dues à la présence en quantité suffisante dans le milieu de substances actives vis-à-vis de la charge (toxines ou substances provenant de leur métabolisme);

3° L'addition de nitrate de lanthane à des doses qui exaltent la poussée microbienne ou qui lui sont indifférentes, ne modifie pas sensiblement la charge électrique des bacilles.

On n'observe de variations appréciables de charge que pour les concentrations de lanthane qui altèrent ou tuent les germes.

Il ne semble donc pas qu'il y ait une relation entre la valeur de la charge électrique et la multiplication microbienne. L'exaltation de la multiplication provoquée par la présence de petites doses de certains sels comme le nitrate de lanthane ne semble pas être accompagnée d'une variation de l'électrisation de ces germes.

L'inhibition de la poussée ne peut pas être attribuée à une diminution de la charge. La dose toxique de nitrate de lanthane a causé la mort ou l'altération des cellules, et par suite ce sel peut facilement agir sur la charge qui n'est plus défendue.

Il est possible que de très petites variations de la charge accompagnent l'apparition de ces phénomènes; mais si ces variations existent, elles ne peuvent pas être décelées avec la précision de nos méthodes.

Tout ce que nous pouvons dire, c'est qu'on ne peut pas dans nos expériences attribuer les effets observés du lanthane sur le taux de la multiplication microbienne, à une variation de l'électrisation.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Nous avons voulu étudier l'influence de doses diverses de cations plus ou moins chargés électriquement sur la multiplication du bacille pyocyanique. Pour cela, nous avons étudié les méthodes de numération suivantes :

- 1^o La méthode comparative indirecte de WRIGHT-FRIES.
- 2^o La méthode de numération des colonies sur plaques de gélose après dilutions et ensemencement.

Ensuite, nous avons essayé d'expliquer les résultats obtenus en mesurant les charges électriques des microbes traités dans ces conditions.

Nous sommes arrivé aux conclusions suivantes :

1^o Certains cations : le lanthane, le cérium, le plomb, le mercure, l'argent, ajoutés au milieu de culture du bacille pyocyanique, modifient le cours de sa multiplication selon le degré de leur concentration.

2^o Pour certains d'entre eux (lanthane, cérium, plomb, mercure), nous pouvons envisager trois zones de concentrations :

- a) Des concentrations provoquant l'inhibition de la poussée(1);
- b) Des concentrations plus faibles, pour lesquelles on observe un développement qui se rapproche beaucoup de celui des cultures-témoins;
- c) Des concentrations extrêmement faibles, qui provoquent *une exaltation de la poussée*.

C'est ce phénomène que nous nous étions proposé de vérifier et que nous avons pu mettre nettement en évidence.

(1) A ce propos, nous signalons la thèse très intéressante de M^{lle} S. LAMBIN (283) sur « les méthodes de mesure de l'activité microbienne des substances chimiques ».

3° Pour *l'argent*, nous n'avons pas noté l'existence de doses favorisant la multiplication. Nos expériences n'ont mis en relief qu'une action toxique ou indifférente. Ceci est conforme aux résultats trouvés antérieurement par G. BERTRAND (36 bis) sur l'*Aspergillus niger* et par B. SAUTON (427) sur le bacille tuberculeux.

4° Non seulement, il n'y a pas de proportionnalité entre la concentration et la stimulation, mais encore, parfois et sans raisons apparentes, la série des doses excitantes est interrompue brusquement par une dose indifférente. Ce cas peut être constaté notamment pour le nitrate mercurique et le nitrate de plomb.

5° L'examen de nos résultats ne permet pas d'établir de rapports entre les concentrations favorisantes et la valence des métaux envisagés. Ce résultat est conforme aux expériences d'un certain nombre d'auteurs.

6° Les courbes de pousse obtenues à partir des cultures-témoins nous ont permis de retrouver les diverses phases de développement mises en évidence et confirmées par les travaux de J. REGNIER et ses élèves, à savoir :

a) Pour les microbes visibles : une phase logarithmique, une phase de multiplication ralentie et une phase de déclin.

b) Pour les microbes capables de se reproduire après dilutions et repiquage sur gélose : *une phase de latence*, une phase logarithmique, une phase de multiplication ralentie et une phase de déclin.

La présence dans les cultures d'un des sels étudiés maintient en général (exception faite des concentrations toxiques), en leur faisant subir certaines modifications, l'existence de ces différentes phases. C'est ainsi que, pour des doses peu favorables, la phase de latence est plus ou moins allongée; la phase logarithmique peut être notablement diminuée ou peut même disparaître.

Dans le cas de métaux très antiseptiques, tels le mercure et l'argent, la courbe présente pendant la phase de latence *une ou deux inflexions*. Celles-ci traduisent la disparition des germes les plus fragiles, sous l'influence du métal toxique.

Cette action toxique, génératrice d'un allongement de la phase de latence, est en général suivie par un *déclenchement brusque* de la poussée; le nombre maximum de germes est rapidement atteint et aussitôt succède une phase de déclin plus ou moins rapide.

7° Il est intéressant de souligner que *toutes* nos cultures (cultures-témoins et cultures avec cations), n'ont *jamais* présenté le voile caractéristique du bacille pyocyanique. Ceci est à rapprocher d'observations analogues faites par R. DAVID concernant des cultures du même bacille sur certains milieux peu chargés en matières nutritives.

8° Ce ne sont pas les concentrations provoquant les multiplications les plus abondantes et les plus rapides qui donnent aux germes *la vitalité* la plus grande. Nous avons souvent noté que des concentrations peu favorisantes fournissent *un rapport de vitalité* plus élevé et d'une plus longue durée que certaines concentrations très stimulantes.

9° Les plus longues *conservations* de cultures ne sont pas toujours obtenues pour les concentrations en sels métalliques les plus faibles et, partant, les plus favorisantes.

10° Ce n'est pas toujours dans les milieux où la concentration du sel est la plus favorable à la multiplication que *l'apparition du pigment* est la plus rapide et la plus accentuée. Par exemple, certaines doses de nitrate d'argent, quoique peu propices à une bonne multiplication, ont donné une magnifique pigmentation.

11° Nous avons observé que la *morphologie* des bacilles peut être influencée par certaines concentrations de sels métalliques. Les bacilles sont d'autant plus gros et prennent d'autant mieux le colorant que les concentrations sont plus exaltantes. A des concentrations peu favorables ou toxiques, ils deviennent généralement très courts, pour ressembler finalement à des cocobacilles et même à des cocci.

12° L'emploi conjugué de la méthode comparative de WRIGHT-FRIES et de la méthode de numération des colonies après développement sur plaques de gélose nous paraît recommandable. En effet, c'est ainsi que nous avons pu mettre en évidence l'existence de doses favorisantes de nitrate mercurique : l'emploi de la méthode des plaques seule n'aurait montré qu'une action toxique ou indifférente.

13° Des mesures d'électrophorèse nous ont permis d'observer que la vitesse du transport électrique des bactéries est indépendante de la concentration en germes des émulsions.

14° La charge des bacilles reste sensiblement la même pendant toutes les phases caractéristiques de la poussée. A partir de 8 jours seulement, les microbes se montrent beaucoup plus chargés. Cette augmentation de charge *si tardive* provient peut-être de l'apparition, en quantité suffisante dans le milieu, de substances actives vis-à-vis de la charge (toxines ou substances provenant du métabolisme microbien).

15° L'addition de nitrate de lanthane à des doses qui exaltent la poussée microbienne, ou qui lui sont indifférentes, ne modifie pas sensiblement l'électrisation des bacilles. On n'observe de variations appréciables des charges que pour les concentrations de nitrate de lanthane qui altèrent ou tuent les germes.

De tout ce qui précède, nous pouvons donc tirer les déductions générales suivantes.

1° Conformément aux auteurs, de petites doses de certains sels accélèrent la multiplication microbienne tandis que de plus grandes doses l'inhibent.

2° Il faut souligner cependant l'exception de l'argent, métal type de l'action antiseptique.

3° Il ne semble pas qu'il y ait une relation entre la valeur de la charge électrique et la multiplication microbienne normale.

4° Il ne semble pas non plus que l'exaltation et l'inhibition de la poussée bactérienne puisse être attribuée à une variation de l'électrisation des germes.

BIBLIOGRAPHIE

1. ABBOTT (J. F.). — Galvanotropism of bacteria. *Science*, 1908, 27, p. 910.
2. ABDERHALDEN (E.). — Die Verwendung der Gewichts zu- und Abnahme automatisch-registrierender Wage. *Ferment forschung*, 1915, p. 155 et 229.
- 2 bis. ABRAMSON (H. A.). — A new method for the study of cataphoretic protein mobility. *Am. Chem. Soc.*, 1928, 50, p. 390.
3. AGULHON (H.). — Recherches sur la présence et le rôle du bore chez les végétaux. *Thèse Doct. ès Sc.*, 1910, Paris.
4. AGULHON (H.) et SAZERAC (R.). — Activation de certains processus d'oxydation microbiens par les sels d'urane. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, 155, p. 1186.
- 4 bis. AGULHON (H.) et SAZERAC (R.). — Sur l'action favorable exercée par le manganèse sur la fermentation acétique. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1914, 21, p. 321.
5. AGULHON (H.) et SAZERAC (R.). — Action des sels d'uranium et de l'uranium métallique sur le bacille pyocyanique. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, 156, p. 162.
6. ALBUS (W. R.) et HOLM (G. E.). — The effect of surface tension upon the growth of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Journ. of Bacterio.*, 1926, 12, p. 13.
7. ALLEN (P. W.). — The attenuation of bacteria due to temperature shock. *Journ. of Bact.*, 1923, 8, p. 555.
8. ANDREJEW (N.). — Eine neue Methode zur Untersuchung der kolloiden Systeme. *Kolloïd Ztschr.*, 1917, 43, p. 14.
9. ARNDT. — Biolog. Studien I. *Das biologische Grundgesetz*. Greifswald, 1882, d'après A. NIETHAMMER.
10. ARKWRIGHT (J. A.). — On the presence in an emulsion of « *Bacillus typhosus* » of two different substances which are agglutinable by acids, and their relation to serum agglutination. *Ztschr. Immunitätsforsch., Orig.*, 1914, 22, p. 396.
11. ASO, NAGAOKA et SAWA. — *Bull. of the College of Agriculture*, Tokio, 1903-1904, 5 et 6.
12. AUBEL (E.). — Recherches biochimiques sur la nutrition du bacille pyocyanique. Imprimerie E. Lanier, Caen, 1921.
13. AVERY (O. T.), GLENN et CULLEN. — Hydrogen ion concentration of cultures of pneumococci of the different types in carbohydrate media. *Journal of experim. Med.*, 1919, 30, p. 360.

14. AWTONOMOWA (E. S.) et STESSEL (T. A.). — Nephelometrische Methode zur Bestimmung der Anzahl der Mikrobenleiber in bakteriellen Suspension mit Hilfe einer Photozelle. *Biochem. Ztschr.*, 1934, 274, p. 220.
15. BACHRACH (E. D.). — Accoutumance et anaphylaxie chez le bacille lactique. *Thèse Doct. ès Sc.*, Paris, 1924.
16. BAIL (O.). — *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1919, 29.
17. BAILLY (P.). — Contribution à l'étude de quelques terres rares sur l'« *Aspergillus fumigatus* ». *Th. Doct. en Pharm.*, Strasbourg, 1922.
18. BARBER. — The rate of multiplication of « *Bacillus Coli* » at different temperatures. *Journ. of inf. Diseases*, 1908, 5, p. 379.
19. BARNES (L. A.). — Do Broth culture filtrates contains a Bacterial-growth inhibiting substance. *Journ. of Bact.*, 1931, 21, p. 395.
20. BAUDISCH (O.). — Über den Einfluss von Eisenoxyden und Eisenoxydhydraten auf das Wachstum von Bakterien. *Biochem Ztschr.*, 1932, 245, p. 265.
21. BAUDISCH (O.) et JOHNSON. — On the influence of iron oxides and iron oxide hydrates on the growth and virulence of bacteria. *Cong. int. de Physio.*, Roma, 1932.
22. BECHHOLD (H.). — Die Ausflockung von Suspensionen bzw. Kolloiden und die Bakterienagglutination. *Ztschr. physik. Chem.*, 1904, 48, p. 385.
23. BECHHOLD (H.). — Die Löslichkeit schwerlöslicher Silberverbindungen, demonstriert an ihren keimschädigenden Wirkung. *Kolloid Ztschr.*, 1919, 25, p. 158.
24. BECKER (A.). — *Landw. Jahrb.*, 1926.
25. BECQUEREL (P.). — Influence des sels d'uranium et de thorium sur le développement du bacille tuberculeux. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, 156, p. 164.
- 25 bis. BENECKE (W.). — Ein Beitrag zur mineralischen Nahrung der Pflanzen. *Ber. d. Dtsch. Botan. Gesellsch.*, 1894, 12, p. 105.
26. BENECKE (W.). — Die zur Ernährung der Schimmelpilze notwendigen Metalle. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 1895, 28, p. 487.
27. BENIASCH (M.). — Die Säureagglutination der Bakterien. *Ztschr. Immunitätsforsch., Orig.*, 1911-1912, 12, p. 268.
28. BERTHELOT (A.), RAMON (G.) et M^{lle} AMOUREUX. — Recherches biochimiques sur les toxines et leurs dérivés. Étude des facteurs qui influencent l'élaboration de la toxine tétanique et sa transformation spontanée en anatoxine. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1927, 41, p. 83.
- 28 bis. BERTRAND (G.). — Sur l'emploi favorable du manganèse comme engrais. *C. R. Ac. Sc.*, 1905, 141, p. 1255.

29. BERTRAND (G.). — Sur l'emploi favorable du manganèse comme engrais. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1906, 13, p. 10.
- 29 bis. BERTRAND (G.) et JAVILLIER (M.). — Influence du manganèse sur le développement de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1911, 152, p. 225.
30. BERTRAND (G.) et JAVILLIER (M.). — Influence du manganèse sur le développement de l' « *Aspergillus niger* ». *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1911, 18, p. 65.
- 30 bis. BERTRAND (G.) et JAVILLIER (M.). — Influence combinée du zinc et du manganèse sur le développement et la composition minérale de l' « *Aspergillus niger* ». *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1911, 18, p. 321.
31. BERTRAND (G.) et JAVILLIER (M.). — Influence combinée du zinc et du manganèse sur le développement de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1911, 152, p. 900.
- 31 bis. BERTRAND (G.) et JAVILLIER (M.). — Influence du zinc et du manganèse sur la composition minérale de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1911, 152, p. 1337.
32. BERTRAND (G.). — Sur l'extraordinaire sensibilité de l' « *Aspergillus niger* » vis-à-vis du manganèse. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1912, 19, p. 193.
- 32 bis. BERTRAND (G.) et JAVILLIER (M.). — Action du manganèse sur le développement de l' « *Aspergillus niger* ». *Ann. Inst. Pasteur*, 1912, 26, p. 241.
33. BERTRAND (G.). — Sur le rôle capital du manganèse dans la formation des conidies de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1912, 154, p. 381.
- 33 bis. BERTRAND (G.). — Extraordinaire sensibilité de l' « *Aspergillus niger* » vis-à-vis du manganèse. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, 154, p. 616.
34. BERTRAND (G.). — Sur l'extraordinaire sensibilité de l' « *Aspergillus niger* » vis-à-vis du manganèse. *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, 1912, 11, p. 400.
- 34 bis. BERTRAND (G.). — Sur le rôle capital du manganèse dans la production des conidies de l' « *Aspergillus niger* ». *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, 1912, 11, p. 494.
35. BERTRAND (G.) et JAVILLIER (M.). — Action du manganèse sur le développement de l' « *Aspergillus niger* ». *Bull. Soc. Chim.*, 4^e série, 1912, 11, p. 212.
- 35 bis. BERTRAND (G.). — Sur le rôle des infiniment petits chimiques en agriculture. *Ann. Inst. Pasteur*, 1912, 26, p. 852.
36. BERTRAND (G.). — Sur le rôle des infiniment petits chimiques en agriculture. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1913, 20, p. 41.
- 36 bis. BERTRAND (G.). — L'argent peut-il, à une concentration convenable, exciter la croissance de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1914, 158, p. 1213.

- 36 *ter.* BERTRAND (G.) et NAKAMURA (H.). — Sur l'importance physiologique comparée du fer et du zinc. *C. R. Ac. Sc.*, 1924, 179, p. 129.
37. BESREDKA (A.). — Étude sur l'immunité locale. Le pansement antistaphylococcique. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 7.
- 37 *bis.* BESREDKA (A.) et URBAIN (A.). — Étude sur l'immunité locale. Le pansement antistreptococcique. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 506.
38. BESREDKA (A.). — Étude sur l'immunité locale. Staphylocoque : cutivaccination et cuti-immunité. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 88, p. 1273.
- 38 *bis.* BESREDKA (A.) et GOLOVANOFF (M.). — De la vaccination anticholérique. Étude sur l'immunité locale. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 933.
39. BIERNACKI (E.). — Ueber die Eigenschaft der Antiseptica, die Alkoholgährung zu beschleunigen und über gewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur, der Fermentmenge und der Vereinigung miteinander. *Pflüger's Arch.*, 1891, 49, p. 112.
40. BOEZ (L.). — Milieu de culture pour le bacille tuberculeux à base de peptone pancréatico-intestinale. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1926, 40, p. 746.
41. BOHN (G.) et DRZEWINA (A.). — Accélération et inhibition de la croissance des plantes par l'argent métallique. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, 109, p. 638.
42. BOKORNY. — Über den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Keimung der Pflanzensamen-Wachstumsförderung durch einige. *Biochem. Ztschr.*, 1913, 50, p. 1.
43. BOLAND. — Inaug. Dissert. Amsterdam, 1902 (d'après J. LANE CLAYPON).
44. BORTELS (H.). — Über die Bedeutung von Eisen, Zink und Kupfer für Mikroorganismen. *Biochem. Ztschr.*, 1927, 182, p. 301.
45. BRAMBRING (F.). — Untersuchungen über die Wirkungen des Aluminiums auf Wasserpflanzen. *Jahrb. f. Wissensch. Bot.*, 1930, 73, p. 241.
46. BREED (R.) et BREW (J.). — Counting bacteria by means of the microscope. *Technical bulletin N° 49. New-York Agricult. Exper. Station*, 1916, p. 1-31 (d'après BUCHANAN et FULMER).
47. BROWN (H. C.) et BROWN (J. C.). — Further observations on bacterial cataphoresis. *Brit. J. exper. Path.*, 1932, 13, p. 334.
48. BRUNNER (G.) et ZAWADZKI (A.). — Zählplatte zu den Petri'schen Schalen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1893, 14, p. 616.
49. BUCHANAN (R. E.). — Life phases in bacterial cultures. *Journ. of inf. Diseases*, 1918, 23, p. 109.

50. BUCHANAN (R. E.) et FULMER (E. J.). — Physiology and Biochemistry of Bacteria. 1 vol., Baillière, Tindall and Cox, London, 1928.
51. BUCHANAN (R. E.). — Growth curves of bacteria. In the newer knowledge of Bacteriology and Immunology de Jordan (E. O.) et Falk (I. S.), chapitre V, p. 46.
52. BUCHANAN (R. E.) et FULMER (E. J.). — Growth phases and growth rates in cultures of microorganisms, in Physiology and Biochemistry of Bacteria, Chapitre II, p. 4.
53. BUCHNER (H.), LONGARD (K.) et RIEDLIN (G.). — Über die Vermehrungs geschwindigkeit der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1887, 2, p.1-6.
54. BUHRMANN (I.). — Beiträge zur Kenntnis der oligodynamischen Wirkung mit besonderer Berücksichtigung der In- und Reaktivierung von Silber. *Ztschr. Hyg. Infectk.*, 1933, 115, p. 241.
55. BURGESS (K. E.). — The toxicity towards staphylococcus of dilute phenol solutions containing sodium benzoate. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, 24, p. 738.
56. BURKE (V.) et GIBSON (F.). — The Gram reaction and the electric charge of bacteria. *Journ. of Bacterio.*, 1933, 26, p. 211.
57. BURTON (E. F.). — The physical properties of colloidal solutions, London and New-York, 2nd edition, 1921.
- 57 bis. BURTON (E. F.). — Cataphoresis : the motion of colloidal particles in an electrical field. Fourth report on colloid chemistry and its general and industrial applications, London, 1922, p. 23-33.
58. BUTKEWITSCH (Wl.) et ORLOFF (Fr.). — Zur Frage nach den « ökonomischen Koeffizienten » bei « *Aspergillus niger* ». *Biochem. Ztschr.*, 1922, 132, p. 556 (d'après A. NIETHAMMER).
59. BUXTON (B. H.) et SHAFFER (P.). — Die Agglutination und verwandte Reaktionen in physikalischer Hinsicht. I., *Ztschr. physik. Chem.*, 1906-1907, 57, p. 47.
60. CALLISSON (J. G.). — A diluting fluid for standardisation of vaccines with the hemocytometer. *J. of Med. res.*, 1912, 27, p. 225.
61. CARDIN (A.). — Sui fenomeni microelettroforetici dei batteri. *Arch. di. Sci. biol.*, 1934, 20, p. 139.
62. CARLSON (T.). — Über Geschwindigkeit und Grösse der Hefevermehrung in Würze. *Biochem. Ztschr.*, 1913, 57, p. 313.
63. CARDOT (C. H.) et CARDOT (H.). — Analogie entre les ferments lactiques et les streptocoques au point de vue de l'action des antiseptiques. *C. R. Ac. Sc.*, 1917, 165, p. 272.
64. CARNOT (P.). — Rapport sur l'état actuel de la question des antiseptiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1918, 81, p. 1166.

65. CARNOT (P.) et DUMONT (J.). — Technique d'étude de la pénétration des antiseptiques en milieux solides. *C. R. Soc. Biol.*, 1918, 81, p. 1199.
66. CARPENTER (P.), FULTON (Mac) et STUART (C. A.). — Stimulierung der Geschwindigkeit des Bakterienwachstums durch Methylgermaniumoxyd. *Journ. Bact.*, 1935, 30, p. 137.
67. CASAGRANDE (G.) et SEPPILLI (A.). — L'azione oligodinamica dei metalli con particolare riguardo alle sue applicazioni per la potabilizzazione dell'acqua. *Rev. di Biol.*, 1934, 16, p. 14.
68. CERNOVODEANU (M^{lle} P.) et HENRI (V.). — Détermination du signe électrique de quelques microbes pathogènes. *C. R. Soc. Biol.*, 1906, 61, p. 200.
69. CHAPMAN (G. H.). — Electrophoretic potential as an aid in identifying strains of the B. Coli group. *Journ. of Bacterio.*, 1929, 18, p. 339.
70. CHASSEVANT (A.). — Action des sels métalliques sur la fermentation lactique. *Thèse Doct. en Méd.*, 1897, Paris.
71. CHASSEVANT (A.). — Travaux du Labor. de physiologie de Ch. RICHET, 1898, 4, p. 246-296.
72. CHASSEVANT (A.) et RICHET (Ch.). — De l'influence des poisons minéraux sur la fermentation lactique. *C. R. Ac. Sc.*, 1893, 117, p. 673.
74. CHATRON (M.). — Étude de deux microméthodes de dosage de l'ion SO⁴. Application au dosage du soufre sanguin. *Th. Doct. Pharmacie*, Girault, Saint-Cloud, 1930.
75. CHESNEY (Alan M.). — The latent period in the growth of bacteria. *Journ. of experim. Med.*, 1916, 24, p. 387.
76. CHICK (Miss H.). — The bacterioidal properties of blood serum. *Journ. of Hygiene*, 1912, 12, p. 414.
77. CHOUCROUN (M^{lle} N.). — Électrisation d'adsorption. *Th. Doct. ès Sc.*, Paris, 1923.
- 77 bis. CHOUCROUN (M^{lle} N.). — Électrisation d'adsorption, colloïdes et membranes. *Journ. Chim. Phys.*, 1923, 20, p. 352.
78. CHOUCROUN (M^{lle} N.). — Un dispositif correct d'électrophorèse. *C. R. As. Sc.*, 1933, 196, p. 777.
79. CHOUCROUN (M^{lle} N.). — Moments électriques superficiels au sein d'un liquide. *C. R. As. Sc.*, 1934, 199, p. 36.
80. CHOUCROUN (M^{lle} N.) et PLOTZ (H.). — Différences entre les électrisations de diverses variétés de bacilles tuberculeux. *C. R. Ac. Sc.*, 1934, 199, p. 165.
81. CHOUCROUN (M^{lle} N.). — L'électrisation superficielle, caractère spécifique des micro-organismes. *C. R. Ac. Sc.*, 1936, 202, p. 1711.
82. CHOUCROUN (M^{lle} N.). — L'électrisation superficielle, caractère spécifique des bactéries. *C. R. Ac. Sc.*, 1936, 202, p. 1822.

83. CLARK (P. F.) et RUEHL (W. H.). — Morphological changes during the growth of bacteria. *Journ. of Bact.*, 1919, 4, p. 615.
84. CLAYPON (J. E. Lane). — Multiplication of bacteria and the influence of temperature and some other conditions. *Journ. of Hygiene*, 1919, 9, p. 239.
85. CLÉMENT (H.). — Action de l'argent sur la végétation de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 749.
86. CLUZET, ROCHAIX et KOFMAN. — Sur le galvanotropisme des microbes. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 38, p. 779.
87. COHEN (B.) et CLARK (M.). — The growth of certain bacteria in media of different hydrogen ion concentrations. *Journ. of Bact.*, 1919, 4, p. 409.
89. COPAUX (H.). — Procédé rapide pour doser l'acide phosphorique. *C. R. Ac. Sc.*, 1921, 173, p. 656.
90. COPLANS (Myer). — Influence affecting the growth of microorganisms latency. Inhibition. Mass action. *Journ. of Pathology and Bact.*, 1910, 14, p. 1.
91. COSTANTIN. — Étude expérimentale de la compressibilité osmotique des émulsions. *C. R. Ac. Sc.*, 1914, 158, p. 1171.
92. COTTON et MOUTON. — Les ultramicroscopes. 1906, Masson, Paris.
93. COUPIN (H.). — Sur la toxicité des sels de cuivre à l'égard des végétaux supérieurs. *C. R. Ac. Sc.*, 1898, 127, p. 400.
94. COUPIN (H.). — Sur la nutrition du « *Sterigmatocystis nigra* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1903, 136, p. 392.
96. CRADY (Mac M. H.). — The numerical interpretation of fermentation tubes results. *Journ. of inf. Diseases*, 1915, 17, p. 183.
97. CRADY (Mac M. H.). — Tables for rapid interpretation of fermentation tubes results. *Pub. Health. J. Toronto*, 1918, 9, p. 201 (d'après BUCHANAN).
98. CRAMER (W.). — Die Wasserversorgung von Zürich und ihr Zusammenhang mit der Typhusepidemie des Jahres 1884. Zürich, 1885 (d'après WINSLOW).
99. CUGINI (G.). — *Ref. Just. Jahresber.*, 1876, 4, p. 113.
100. CZAPEK. — Biochemie der Pflanzen, 1913, 1 (d'après H. ZELLER).
101. DALE (H.). — Galvanotaxis and chemotaxis of ciliate infusoria. *Journ. of Physiology*, 1900-1901, 26 (part. I), p. 291.
102. DAMBOVICEANU (A.). — Caractérisation des formes microbiennes « R » et « S » par leur potentiel électrique. *C. R. Soc. Bio.*, 1930, 103, p. 633.
103. DANNENBERG (H.). — Über Hefegärung. Zur Frage der Gültigkeit der Arndt-Schulzschen Regel. *Arch. f. exp. P. und P.*, 1930, 154, p. 211.

104. DAVID (R.). — Contribution à l'étude numérique de la multiplication du bacille pyocyanique dans différents milieux de culture liquides. *Thèse Doct. ès Sc.*, Imprimerie Durand, Chartres, 1931.
105. DAVIS (N.). — Interfacial tension and bacterial growth. *Journ. of Bacterio.*, 1927, 13, p. 381.
106. DAVISON. — The diagnosis of enteric fever (typhoid and paratyphoid A and B) by agglutination tests. *Journ. Amer. Med. Ass.*, 1916, 66, p. 1297.
108. DERNEY et AVERY. — The optimum hydrogen ion concentration for the growth of Pneumococcus. *Journ. of experim. Med.*, 1918, 18, p. 345.
109. DEVAUX (H.). — Empoisonnement spontané des plantes aquatiques par les eaux du Laboratoire de Botanique. *Mémoires de la Société des Sc. physiques et naturelles de Bordeaux*, 5^e série, 1896, 1.
110. DEVAUX (H.). — De l'absorption des poisons métalliques très dilués par les cellules végétales. *C. R. Ac. Sc.*, 1901, 132, p. 717.
111. DEVAUX (H.). — Généralité de la fixation des métaux par la paroi cellulaire. *C. R. Ac. Sc.*, 1901, 133, p. 58.
112. DEVAUX (H.). — Action rapide des solutions salines sur les plantes vivantes : déplacement réversible d'une partie des substances basiques contenues dans la plante. *C. R. Ac. Sc.*, 1916, 162, p. 561.
113. DHÉRE (Ch.) et GORGOLEWSKI (M.). — Sur l'obtention par dialyse électrique d'un sérum extrêmement appauvri en électrolytes. *C. R. Ac. Sc.*, 1910, 150, p. 993.
114. DHÉRE (Ch.). — Recherches sur les propriétés physico-chimiques de la gélatine déminéralisée. *Journ. Physiol. et Pathol. gén.*, 1911, 13, p. 157.
- 114 bis. DHÉRE (Ch.). — Quelques observations sur la préparation et les propriétés des sérums déminéralisés. *C. R. Soc. Biol.*, 1911, 70, p. 42.
115. DHÉRE (Ch.). — Elektrodialyse in der Biochemie. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1926, 8, p. 144 et p. 604.
116. DHÉRE (Ch.). — Elektrodialyse in der Biochemie. *Kolloid Ztschr.*, 1927, 41, p. 243 et p. 315.
117. DICHTL (G.). — Ueber die Bestimmung der Keimzahl in Bakterien Kulturen. *Arch. f. Hyg.*, 1920, 83, p. 47.
118. DJANIN. — *C. R. Soc. Biol.*, Saint-Petersbourg, 1892.
119. DMITRIJEW (S. A.). — Desinfektion des Wassers mit löslichen Silbersalzen. *Militär. med. Ztschr.*, 1933, 4, p. 357.
120. DOERR (R.). — Zur oligodynamie des Silbers. *Biochem. Ztschr.*, 1920, 106, p. 110, et 1920, 107, p. 207.

121. DOLD (H.). — Kritische Betrachtungen über die Bestimmung und Bewertung der Keimzahl bakterieller Impfstoffe. *Dtsch. med. Woch.*, 1925, p. 1851.
122. DOZOIS (K. P.), TITSLER (R. P.), LISSE (M. W.) et DAVEY (W. P.). — The effect of « low voltage » X-rays on the electrophoretic migration velocity, viability et pH of *Escherichia coli* suspensions. *Journ. of Bacterio*, 1932, 24, p. 123.
123. DRECHSEL (O.). — Zur Kenntnis der sog. oligodynamischen Erscheinungen. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, 1921, 53, p. 288.
124. DREYER, DUNCAN et GARDNER. — A general method of estimation the relative turbidity or opacity of fluid suspension including bacterial emulsions. *Biochem. Journ.*, 1916, 10, N° 3, p. 399.
125. DREYER (G.). — A simple procedure for the accurate numeration of blood cells and bacteria, without the use of a counting chamber. *The Lancet*, 29 janvier 1921, 200, p. 219.
126. DUTHOIT (A.). — Action sur différents microbes du chlorure de sodium à divers taux de concentration. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 550.
127. DUTHOIT (A.). — De l'action sur différents microbes du chlorure de sodium seul ou associé à d'autres sels. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 553.
128. EFFRONT (J.). — Influence de la constance du milieu sur le développement et le travail chimique des microorganismes. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 91, p. 1175.
129. EFFRONT (J.). — De l'influence des composés du fluor sur les levures de bière. *C. R. Ac. Sc.*, 1894, 119, p. 169.
130. EGG et YUNG. — *Biochem. Ztschr.*, 1930, 221, p. 1347 (d'après DOERR).
131. EGGERTH (A. H.) et BELLOWES (M.). — The flocculation of bacteria by proteins. *Journ. Gen. of Physiol.*, 1921-1922, 4, p. 669.
132. EGGERTH (A. H.). — Changes in the stability and potential of cell suspensions. I. The stability and potential of « *Bacterium coli* ». *Journ. Gen. Physiol.*, 1923, 6, p. 63.
133. EICHBAUM (F.). — Die Wertbestimmung « oligodynamischer » Silberwässer in biologischen Versuch. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1932, 126, p. 128.
134. EIJKMANN (C.). — Über thermolabile Stoffwechsel produkte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1904, 37, p. 436.
135. EISENBERG (P.). — Untersuchungen über spezifische Desinfektionsvorgänge. II. Mitth. über die Wirkung von Salzen und Ionen auf Bakterien. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, I. Or., 1918, 82, p. 69.

136. ELLIS (R.). — Die Eigenschaften der Olemulsionen. I. Die elektrische Ladung. *Ztschr. phys. Chem.*, 1912, 78, p. 321.
137. ENSLIN (O.), LINDAU (G.) et RHODIUS (R.). — Über eine verbesserte Methode zur Bestimmung der elektrophoretischen Wanderung Geschwindigkeit suspendierter Teilchen und ein Verfahren zur Messung der Ladung hydrophober Sole. *Kolloid Ztschr.*, 1935, 70, p. 189.
138. ESTOR (W.). — Quantitative Untersuchungen über die Beziehungen zwischen dem Wachstum von Bakterien und Pilzen und der Konzentration einiger Neutralsalzen. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, II, 1927, 72, p. 411.
139. ESTY (J. R.) et MEYER (K. F.). — The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobies. *Journ. of inf. Diseases*, 1922, 31, p. 650.
140. FAGUET (M.). — Contribution à l'étude de la multiplication microbienne (*Bact. coli*). *C. R. Ac. Sc.*, 1932, 194, p. 1027.
141. FAGUET (M.). — Une nouvelle méthode d'étude de la multiplication microbienne. *C. R. Ac. Sc.*, 1932, 194, p. 1763.
142. FAGUET (M.). — Étude photométrique de la multiplication microbienne. *C. R. Ac. Sc.*, 1935, 200, p. 498.
143. FAGUET (M.). — Diagnostic photométrique de Bacille d'Eberth, du para A, du para B, du Colibacille. *C. R. Ac. Sc.*, 1935, 200, p. 1637.
144. FALK (I. S.) et SHAUGHNESSY (J. H.). — Effect of certain electrolytes on the buffering power of *Bacterium coli*. *Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.*, 1922-1923, 20, p. 426.
145. FALK (I. S.). — The rôle of certain ions in bacterial physiology. A review (Studies on salt action). *Abstr. of Bact.*, janvier 1923, 7, p. 33.
146. FALK (I. S.) et WINSLOW (C. E. A.). — A contribution to the dynamics of toxicity and the theory of disinfection. *Journ. of Bact.*, 1926, 11, p. 1.
147. FALK (I. S.), GUSSIN (H. A.) et JACOBSON (M. A.). — Studies on respiratory diseases. Electrophoretic potential and virulence of *Pneumococci* (types 1, 2, 3 et 4). *Journ. Inf. Dis.*, 1925, 37, p. 481.
148. FALK (I. S.), JACOBSON (M. A.) et GUSSIN (H. A.). — Studies on respiratory diseases. Some relation between fatality in lobar pneumonia and electrophoretic potentials on pneumococci. *Journ. Inf. Dis.*, 1925, 37, p. 495 et 499.
149. FALK (I. S.) et JACOBSON (M. A.). — Studies on respiratory diseases. Electrophoretic potential virulence and serum agglutination with single cell cultures of variants of type I pneumococci. *Journ. Inf. Dis.*, 1925, 37, p. 507.
150. FALK (I. S.) et HARRISON (R. W.). — The influence of Hydrogen Ion concentration upon the viscosity of Bacterial suspensions. *Journ. of Bacteriol.*, 1926, 12, p. 97.

151. FALK (I. S.), JENSEN (L. B.) and MILLS (J. H.). — Electrophoresis of Diphtheria bacilli. The development of a simplified technique for electrophoretic measurement of the virulence of diphtheria bacilli. *Journ. of Bacterio.*, 1928, 15, p. 421.
- 151 bis. FALK (I. S.). — « A theory of microbe virulence », Electrophoresis of bacteria and other microorganismes and some relations to immunological theory. *Colloid Chemistry*, 1923, 2.
152. FEILER (M.). — Weitere Untersuchungen über die oligodynamischen Wirkungen der Alkaloide auf *Paramecium caudatum*. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, II Abt., 1930, 80, p. 505.
153. FEILER (M.). — Über den Einfluss der höheren Verdünnungsstufen von Chinin auf das Wachstum der Bakterienflora des Henaufgusses. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, II Abt., 1931, 83, p. 63.
154. FLEURY (M. P.) et SUTU (Z.). — *Journ. Pharm. et Chim.*, 1926, II, p. 431 (d'après J. MORCHOISNE).
155. FOKKER (A. P.). — *Ztschr. für Hygiene und Infektionskrankh.*, 1890, 9, p. 41 (d'après WINSLOW).
156. FRANKLAND. — *Ztschr. für Hygiene*, 19 (d'après EIJKMAN).
157. FRASER (C. G.). — The action of methylene blue and certain other dyes on living and dead yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, 24, p. 741.
158. FREUNDLICH (H.) et SOLLNER (K.). — Zur Erklärung der oligodynamischen Wirkung. *Biochem. Ztschr.*, 1928, 203, p. 1.
- 158 bis. FREUNDLICH (H.) et ABRAMSON (H. A.). — *Ztschr. physikal. Chem.*, 1927, 128, p. 25.
159. FRICK (K.) et KRUGER (R.). — Gilt das Arndt-Schulz'sche Gesetz für Röntgenstrahlen? *Ztschr. für Klin. Med.*, 1924, 99, p. 264.
160. FRIES. — Eine einfache Methode zur genauen Bestimmung der Bakterienmengen in Bakteriensuspensionen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1921, 86, p. 90.
161. FROUIN (A.) et LEDEBT (M^{lle} S.). — Action des sels de vanadium et de terres rares sur le développement du bacille tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, 72, p. 1034.
162. FROUIN (A.) et LEDEBT (M^{lle} S.). — Action du vanadate de soude et des terres rares sur le développement du bacille pyocyanique et la production de ses pigments. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, 72, p. 981.
163. FROUIN (A.). — Action du sulfate de lanthane sur le développement du « *B. Subtilis* ». *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 196.
164. FROUIN (A.). — Action des sels de terres rares sur le développement du bacille tuberculeux et de l'« *Aspergillus niger* ». *C. R. Soc. Biol.*, 1912, 73, p. 640.
165. FROUIN (A.). — Influence des sels d'uranium et de thorium sur le développement du bacille tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 282.

166. FROUIN (A.). — Action favorisante des sels de terres rares sur le développement du bacille tuberculeux. *C. R. Soc. Biol.*, 1915, 78, p. 129.
167. FROUIN (A.) et ROUDSKY. — Action bactéricide et antitoxique des sels de lanthane et de thorium sur le vibrion cholérique. *C. R. Ac. Sc.*, 1914, 159, p. 410.
168. FROUIN (A.). — Action du vanadate de soude sur le développement de l'« *Aspergillus niger* ». *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1914, 1, p. 8.
169. FROUIN et MOUSSALI. — Action des sels de terres rares sur le bacille dysentérique. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, 82, p. 973.
170. FROUIN (A.). — Variations des matières grasses du bacille tuberculeux, cultivé sur des milieux définis en présence de terres du groupe cérique. *C. R. Ac. Sc.*, 1920, 170, p. 1471.
171. FROUIN (A.) et GUILLAUMIE (M^{lle} M.). — Nutrition minérale du bacille tuberculeux. Action favorisante ou empêchante des sels de terres rares et des sels de fer. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 89, p. 382.
172. FROUIN (A.) et GUILLAUMIE (M^{lle} M.). — Influence des sels de fer sur le rendement en poids du bacille tuberculeux. Action de ces sels sur l'utilisation de la glycérine. *C. R. Soc. Biol.*, 1924, 90, p. 831.
173. FULLER (G. W.). — *Ann. Rep.*, State Board of Health of Massachusetts for 1894, 1895, 26, p. 461 (d'après WINSLOW).
174. FULMER (E. I.). — The effect of alcohol on the toxicity of phenol towards yeast. *Journ. of Phys. Chem.*, 1921, 25, p. 10.
175. GALECKI (A.). — Koagulationsstudien am Goldhydrosol. *Ztschr. Anorg. Chem.*, 1912, 74, p. 129.
176. GALEOTTI (G.). — Über die Wirkung kolloidaler und electrolytischer dissociierter Metallösungen auf die Zellen. *Biol. Centralbl.*, 1901, p. 321.
177. GALIMARD (J.) et LACOMME (L.). — Les acides aminés comme nouveaux milieux de culture chimiquement définis pour l'étude des microbes. *Journ. Physiol. et Path. gén.*, 1907, 9, p. 481.
178. GALLI VALERIO. — *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 652 (d'après G. THIRY).
179. GARROD (L. P.). — Germicide et désinfectant. *Pharmaceut. Journ.*, 1935, p. 323.
180. GATES (Fr.). — A method of standardizing bacterial suspensions. *Journ. of experim. Med.*, 1920, 31, p. 105.
181. GÉNAUD (P.). — Les échanges d'ions entre cellules de levures et solutions de chlorure d'ammonium. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, 188, p. 1513.
182. GENAUD (P.). — Recherches sur les échanges d'ions entre cellules de levure et solutions salines. *An. de Physio. et Physi. Chim. biol.*, 1930, 6, p. 240.

- 182 bis. GENAUD (P.). — Les échanges d'ions entre cellules de levures et solutions de nitrate de plomb. *C. R. Ac. Sc.*, 1929, 189, p. 597.
183. GENEVOIS (L.). — Les échanges d'ions dans les tissus végétaux (d'après les travaux de H. DEVAUX). *Protoplasma*, 1930, 10, p. 478.
184. GERASSIMOW. — *Journ. Russ. Phys. Chem. Ges.*, 1926, 58, p. 601.
185. GIRARD (P.). — A propos de l'action des sels de terres rares sur les cellules microbiennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 84, p. 442.
186. GIRARD (P.) et AUDUBERT (R.). — Les charges électriques des microbes et leur tension superficielle. *C. R. Ac. Sc.*, 1918, 167, p. 264 et 351.
187. GIRARD (P.) et GUASTALLA (M^{me}). — Au sujet de l'électrophorèse des milieux biologiques. *Rev. scientif. illustrée (rose)*, 1932, 7, p. 221, et *C. R. As. sc.*, 1932.
188. GESSARD (C.). — Diagnose pigmentaire du bacille pyocyanique. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1919, 33, p. 241.
189. GLYNN (E.), POWELL (M.), REES (A. A.) et COX (G. L.). — Observations upon the standardisation of bacterial vaccines by the Wright, the haemocytometer and the plate culture methods. *Journ. of Pathology and Bact.*, 1913-1914, 18, p. 379.
190. GOSIO. — *Boll. della R. Acc. Med. di Roma*, 1917, 42, p. 3-4 (d'après F. VLÈS).
191. GOTSCHLICH et WEIGANG. — Über die Beziehung zwischen Virulenz und Individuenzahl einer Cholerakultur. *Ztschr. für Hygiene* 1895, 20, p. 376.
192. GOVAERTS. — *C. R. Soc. Biol.*, 1920, 83, p. 197.
193. GÖSSL. — Über das Vorkommen des Mangans in der Pflanze. *Beihefte z. bot. Centralbl.*, 1905, 18 (1^{re} partie), p. 119.
194. GREENWOOD (M.) et UDNY (Yule G.). — On the statistical interpretation of some bacteriological methods employed in water analysis. *Journ. Hyg.*, 1917, 16, p. 36-54.
195. GRIMBERT (L.). — Diagnostic des bactéries par leurs fonctions biochimiques. *Th. Doct. en méd.* Librairie scientifique et littéraire. Rudeval, Paris, 1903.
196. GROHMANN (G.). — Zur Kenntnis Wasserstoff oxydierender Bakterien. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, 1924, 51, p. 256.
197. GRUNDMANN (E.). — Ein Verfahren zur quantitativen Gewinnung von Bakterientrockensubstanz aus flüssigen Nährmedien. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, 1933, 89, p. 318.
198. GRUNFELD (O.). — Über die Entleerung und Wiederauffüllung isolierter Getreideendosperme, insbesondere von Mars, unter aseptischen Bedingungen. *Beihefte z. Bot. Centralbl.*, 1926, 43, p. 167.

199. GUILLEMET (R.). — L'action de faibles doses de cuivre sur la fermentation alcoolique de la levure. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 116, p. 1404.
200. GUILLIERMOND (A.) et CHOUCROUN (M^{lle} N.). — Essai d'électrophorèse à l'intérieur des cellules végétales. *C. R. Ac. Sc.*, 1936, 203, p. 225.
201. GUNTER (G.). — Über die hemmende und tötende Wirkung von Silbernitrat in Nährboden und Elektrolyten. *Arch. für Hygiene*, 1933, 110, p. 38.
202. GUNTHER (E. von). — Beitrag zur mineralischen Nahrung der Pilze. Diss. Erlangen. 1897.
204. GUTHERZ. — Der Partialtod. Iena, 1926 (d'après H. ZELLER).
205. HABER et JAENICKE. — *Ztschr. f. anorg. und allgem. Chem.*, 1925, 147, p. 156.
206. HABER, JAENICKE et MATTHIAS. — Über die angebliche Darstellung « künstlichen » Goldes aus Quecksilber. *Ztschr. f. anorg. und. allgem. Chem.*, 1926, 153, p. 153.
207. HABERLANDT (G.). — *Biol. Centralblatt*, 1922, 42, p. 145 (d'après A. NIETHAMMER).
208. HAHN (F. L.). — Zur Kenntnis der oligodynamischen Silberwirkung. *Biochem. Ztschr.*, 1932, 250, p. 101.
209. HANDOWSKY. — *Münch. Med. Wochenschr.*, 1925, p. 652.
210. HARDY (W. B.). — A preliminary investigation of the conditions which determine the stability of irreversible hydrosols. *Proc. Roy. Soc., London*, 1899, 66, p. 110.
211. HARDY (W. B.). — On the coagulation of proteid by electricity. *Journ. of gen. Physiol.*, 1899, 24, p. 288.
212. HARLAY. — *Thèse doctorat en pharmacie*, Paris, 1900 (d'après J. MORCHOISNE).
213. HARRISSON (W. S.). — *Journ. Roy. Inst. Publ. Health*, London, 1905, 4, p. 313 (d'après GLYNN).
214. HARTMUK (H.). — Versuche zur Pharmakologie der Zellvermehrung. Tübingen : Diss., 1933, p. 21.
215. HARVEY. — The Tinturometer. *Ind. Journ. Med. Res.*, 1919, 7, p. 346-352 (d'après F. VLÈS).
216. HATTORI. — Studien über die Einwirkung der Kupfersulfats auf einige Pflanzen. *Journ. College of Sciences Tokyo*, 1901, 15, p. 371.
217. HATTORI et FRED. — *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, 1928, 74, p. 333 (d'après ROBERG).
218. HECKSCHER (H.). — Méthode pour la numération microscopique des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 84, p. 1039.
219. HECKSCHER (H.). — Détermination néphélométrique des émulsions bactériennes. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 85, p. 378.

220. HECKSCHER (H.). — Nouvelle méthode pour la numération des bacilles vivants contenus dans une émulsion. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 85, p. 612.
221. HEHEWERTH (F. H.). — Die mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien von Alex. Klein, und einige Anwendungen derselben. *Archiv. für Hygiene*, 1901, 39, p. 321.
222. HENRI (V.). — Remarques à propos de la communication de A. FROUIN. *C. R. Soc. Biol.*, 1912, 72, p. 1037.
223. HENRICI (A. T.). — A Statistical study of the form and growth of a spore bearing bacillus. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1921, 19, p. 132.
224. HENRICI (A. T.). — Differential counting of living and dead cells of bacteria. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, 20, p. 293.
225. HENRICI (A. T.). — A statistical study of the form and growth of *Bacterium coli*. *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1923, 21, p. 215.
226. HENRICI (A. T.). — Influence of age of parent culture on size of cells of «*Bacillus megatherium*». *Proc. Soc. exp. Biol. and Med.*, 1924, 21, p. 343.
227. HENRIQUES (O. M.). — Technique de numération des bactéries. *C. R. Soc. Biol.*, 1923, 88, p. 819.
228. HESSE (W.). — Über die gasförmigen. Stoffwechselprodukte beim Wachstum der Bakterien. *Ztschr. für Hygiene*, 1893, 15, p. 17.
229. HESSE (W.) et RIEDNER. — Die quantitative Bestimmung von Bakterien in Flüssigkeiten. *Zeitsch. für Hygiene*, 1906, 53, p. 259.
230. HEUBNER (W.). — Über die Aufnahme von Quecksilber durch Pflanzen. *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.*, 1926, 111, p. 40.
231. HEUBNER (W.). — Über den Begriff «*Reizstoff*». *Klin Wochenschr.*, 1926, p. 1 (d'après A. NIETHAMMER).
232. HOEBER (R.). — *Pflügers's Archiv*, 1901, 101, p. 629.
233. HILDEBRANDT (F. M.) et BOYCE (F. F.). — Stimulation of carre molasses fermentation by certain metallic salts. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1931, 83, p. 363.
234. HINGLAIS (M^{me} H.). — Dosage du chlore et du soufre dans les végétaux. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1926, 33, p. 625.
235. HÖBER (R.). — Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe. Leipzig, 4^e édit., 1914.
236. HODER (F.). — Über Oligodynamie. *Münch. Med. Wochenschr.*, 1932, 12, p. 1828.
237. HOLLAND (D. E.). — The effect of potassium and magnesium chlorides on the viability and electrical resistance of «*Bacterium coli communis*». Diss., Yale Univ. Library, 1922.
238. HOLLANDE (A. Ch.) et CRÉMIEUX (G.). — Méthode de numération directe des bacilles de Koch. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 99, p. 122.

239. HOROVITZ. — *Zeitschr. f. Physik.*, 1923, 15, p. 389 (d'après FREUNDLICH et SÖLLNER).
240. HORWATH (D.). — Ein einfaches Verfahren für Bakterienzählung. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, or., 1930, 118, p. 238.
241. HOTCHKISS (M.). — The stimulating and inhibitive effect of certain cations upon bacterial growth. *Journ. Bact.*, 1923, 8, p. 141.
242. HUEPPE (F.). — *Naturw. Einführung ind. Bakterial.*, Wiesbaden, 1896, p. 55 (d'après A. NIETHAMMER).
243. HUEPPE, LAFAR et WINTERBERG. — D'après W. KLEIN, in *Handb. d. Pathog. Mikroorg. von KOLLE, KRAUSE u. UHLENHUTH*, 1930, 10, p. 161.
- 243 bis. HUMPHREY (R. H.). — *Kolloid Ztschr.*, 1926, 38, p. 306.
244. IWANOFF (K. S.). — Ueber die Wirkung einiger Metallsalze und einatomiger Alkohole auf die Entwicklung von Schimmelpilzen. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, 1904, 13, p. 139.
245. JAVILLIER (M.). — Sur l'influence favorable qu'exercent de très petites quantités de zinc sur la végétation de l' « *Aspergillus niger* ». *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1907, 14, p. 694.
246. JAVILLIER (M.). — Sur l'influence favorable de petites doses de zinc sur la végétation du « *Sterigmatocystis nigra* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1907, 145, p. 1212.
247. JAVILLIER (M.). — Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les végétaux. *Thèse Doct. ès Sc.*, 1908, Paris.
248. JAVILLIER (M.). — Sur la fixation du zinc par le « *Sterigmatocystis nigra* ». *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1908, 15, p. 129.
249. JAVILLIER (M.). — Sur la fixation du zinc par le « *Sterigmatocystis nigra* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1908, 146, p. 365.
- 249 bis. JAVILLIER (M.). — Le zinc chez les plantes. *Ann. Inst. Pasteur*, 1908, 22, p. 720.
250. JAVILLIER (M.). — Sur la présence et le rôle du zinc chez les plantes. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1908, 15, p. 561.
- 250 bis. JAVILLIER (M.). — Influence exercée par le zinc sur l'utilisation par l' « *Aspergillus niger* » de ses aliments hydrocarbonés, azotés et minéraux. Définition nouvelle des coefficients d'utilité spécifique des éléments. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1912, 19, p. 513.
251. JAVILLIER (M.). — Recherches sur la substitution au zinc de divers éléments chimiques pour la culture de l' « *Aspergillus niger* ». Étude particulière du cadmium et du glucinium. *Ann. Inst. Past.*, 1913, 27, p. 1021.
- 251 bis. JAVILLIER (M.). — Influence de la suppression du zinc du milieu de culture de l' « *Aspergillus niger* » sur la sécrétion de sucrase par cette mucédinée. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, 155, p. 308.

252. JAVILLIER (M.) et SAUTON (B.). — Le fer est-il indispensable à la formation des conidies de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1911, 153, p. 1177.
- 252 bis. JAVILLIER (M.) et TCHERNOROUTZKY (H.). — Influence comparée du zinc, du cadmium et du glucinium sur la croissance de quelques Hyphomycètes. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, 157, p. 1173.
253. JAVILLIER (M.). — Une cause d'erreur dans l'étude de l'action biologique des éléments chimiques. La présence de traces de zinc dans le verre. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1914, 21, p. 22.
- 253 bis. JAVILLIER (M.). — Nouveaux faits relatifs à l'intervention du zinc dans le développement de l' « *Aspergillus niger* ». La culture de l' « *Aspergillus* » sur milieux profonds. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1914, 21, p. 278.
254. JAVILLIER (M.). — Sur la culture de l' « *Aspergillus niger* » dans des milieux où le zinc est remplacé par divers éléments chimiques (cuivre, uranium, vanadium). *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1914, 21, p. 452.
- 254 bis. JAVILLIER (M.). — Utilité du zinc pour le développement de l' « *Aspergillus niger* » cultivé sur milieux profonds. *Bull. Soc. Chim.*, 1914, IV, p. 568.
255. JENSEN (L. B.) et FALK (I. S.). — Electrophoresis of Diphtheria bacilli. Some relations between the virulence, toxigenicity, and electrophoretic mobilities of diphtheria bacilli. *Journ. of Bacterio.*, 1928, 15, p. 367.
256. JENSEN (L. B.), FALK (I. S.), TONNEY (F. O.) and WHITE (J. L.). — Electrophoresis of Diphtheria bacilli. Micro-electrophoresis and the differentiation of virulent and non-virulent diphtheria bacilli. *Journ. of Bacterio.*, 1928, 15, p. 413.
257. JOACHIMOGLU (G.). — Über die Wirkung von Sublimat, Phenol und Chinin auf Hefe, *Biochem. Ztschr.*, 1922, 130, p. 239.
258. JOACHIMOGLU (G.). — Über die Abhängigkeit der keimtötenden und entwicklungshemmenden Wirkung von der Valenz. *Biochem. Ztschr.*, 1917, 79, p. 144.
- 258 bis. JORDON et FALK (I. S.). — The never knowledge of Bacteriology and Immunology (University of Chicago Press), p. 565.
259. KALITIN. — Annalen des wissenschaftlichen Meliorations Instituts, 1924, 7.
260. KANTER (R. M.). — Über die Wirkung einiger Salze der Schwermetalle auf das Wachstum und die chemische Zusammensetzung von « *Aspergillus niger* ». *Ref. Bot. Centralbl.*, 1904, 95, p. 369.
261. KAPLAN (A.). — Influence du nombre des microbes ensemencés sur la multiplication du bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Th. Doct. en Pharm.*, Paris, 1931.
262. KENDRICK (Mac) et PAI. — The rate of multiplication of micro-organisms. A mathematical study. *Proc. Roy. Soc. Edimburg*, 1911, 21, p. 649 (d'après GRAHAM SMITH).

263. KLEBS. — *Arch. für exp. Path. und Pharm.*, 1873, 1.
264. KLEIN (Alex). — Eine neue mikroskopische Zählungsmethode der Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1900, 27, p. 834.
265. KLEIN (Alex). — Über die Dosierung der Schultzipfstoffe. Berlin. *Klin. Wochenschrift*, 10 avril 1916, p. 395-399.
266. KLEIN (W.). — Die Methoden der Keimzählung, *Handbuch der pathogenen Mikroorganismen* von KOLLE (W.), KRAUS (R.) u. UHLENHUTH (P.), 1930, 10, p. 161.
267. KLEINMANN (H.). — Ueber ein neues Nephelometer und die Prinzipien nephelometrischer Messungen. *Kolloid Ztschr.*, 1920, 27, p. 236.
268. KLING (A.). — Contribution à l'étude du pouvoir bactéricide de l'argent métallique vis-à-vis du bacille typhique et du colibacille. *C. R. Ac. Sc.*, 1932, 124, p. 1402.
269. KOBER. — Nephelometry in the study of proteases and nucleases. *Journ. of biol. Chem.*, 1913, 13, p. 485.
270. KOFMAN. — Signe électrique des microbes. *Th. Doct. en Méd.*, Lyon, 1927.
271. KOPACZEWSKI (W.). — *Traité de Biocolloïdologie*, t. 1, fasc. 3, p. 461, 1930. Gauthier-Villars, Paris.
272. KOPACZEWSKI (W.). — *Traité de Biocolloïdologie*, t. III, fasc. 1, p. 123. Gauthier-Villars, Paris.
274. KRAUSE (Ch.). — Oligodynamische Wassersterilisierung durch Katadynsilber. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, II Abt., 1930, 80, p. 124 et 1931, 83, p. 308.
275. KROMBOLZ. — Ueber Keimzählung mittel flüssiger Nährboden, mit besonderer Berücksichtigung des Colititer verfahrens. *Arch. für Hygiene*, 1915, 84 et 85, et 1919, 88.
- 275 bis. KRÖNIG (B.) et PAUL (Th.). — Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. *Ztschr. f. Hygiene*, 1897, 25, p. 1.
276. KROSS (W.) et ZUELZER (M.). — Elektrophorese versuche an Spirochäten. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, 1932, 126, p. 360.
277. KRUYT (H. R.) et VAN DER WILLIGEN (P. C.). — Kataphorese und Ladung. *Ztschr. phys. Chem.*, 1927, 130, p. 170.
278. KRUYT (De). — Die Methoden zur Bestimmung der Ladungsgrösse kolloider Teilchen. *Kolloid Ztschr.*, 1925, 37, p. 358.
279. KUHLE (H.). — Über Reizwirkungen von Desinfektionsmitteln. *Pharmaz. Zeitung*, 1935, 80, p. 1010.
280. KÜHNE. — *Journ. of Physiology*, 1900-1901, 26, 1, p. 291 (d'après DALE).
281. LAFAR (F.). — Eine neue Zahlvorrichtung für Plattenkulturen in Petri'schalen. *Ztschr. für Nahrungs mitteluntersuchung u. s. w.*, Wien, 1893, N° 24, p. 429, d'après *Centralblatt für Bakt und Par.*, 1894, 15, p. 331.

282. LANDSTEINER (K.) et PAULI (W.). — Verh. d. 25 Kongresses f. innere Medizin. XXV. Kongress Wien, 1908.
283. LAMBIN (M^{lle} S.). — Méthodes de mesure de l'activité antimicrobienne des substances chimiques. *Thèse Doct. ès Sc.*, Masson, Paris, 1933.
284. LASNITZKI (A.) et SZÖRENYI (E.). — Der Einfluss verschiedener Kationen auf das Wachstum von Hefezellen. *Biochem. Journ.*, 1934, 28, p. 1678.
285. LASSEUR (Ph.) et DUPAIX (M^{lle} A.). — Travaux du laboratoire de microbiologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy, 1931, fasc. 4.
286. LASSEUR (Ph.), PIERRET (E.), DUPAIX (M^{lle} A.) et MAGUITOT (C.). — Remarque sur le pouvoir bactéricide de l'argent métallique. *C. R. Ac. Sc.*, 1932, 194, p. 1024.
287. LASSEUR (Ph.) et JOUFFROY (P.). — Transport électrique des plastides bactériennes. *Trav. lab. de Microbio. Fac. Pharm. Nancy*, 1928, fasc. 1, p. 13.
288. LASSEUR (Ph.), DUPAIX (M^{lle} A.) et FRIBOURG (R.). — Transport électrique des bactéries. (5^e mémoire) *Trav. lab. de Microb. Fac. Pharm. Nancy*, 1934, fasc. 7, p. 195.
289. LASSEUR (Ph.). — Transport électrique des bactéries et des champignons. *Trav. Labo. Microbio. Fac. Pharm. Nancy*, 1930, fasc. 3, p. 161.
290. LASSEUR (Ph.). — Transport électrique des bactéries. Description d'un appareil utilisé dans le transport macroscopique. *Trav. Labo. microb. Fac. Pharm. Nancy*, 1933, fasc. 6, p. 81.
291. LASSEUR (Ph.), PIERRE (E.), DUPAIX (M^{lle} A.) et MAGUITOT (C.). — Pouvoir bactéricide de l'argent métallique. Pouvoir antiseptique de Vincent. Pouvoir oligodynamique de Naegeli. *Trav. Lab. microb. Fac. Pharm. Nancy*, 1932, fasc. 5, p. 13-55.
292. LASSEUR (Ph.), DUPAIX (M^{lle} A.) et FRIBOURG (R.). — Cataphorèse des plastides bactériennes. *Trav. Lab. microb. Fac. Pharm. Nancy*, 1933, fasc. 6, p. 48.
293. LATHAM. — *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 652 (d'après G. THIRY)*.
294. LEDINGHAM (J. C.) et PENFOLD (W. J.). — Mathematical analysis of the lag phase in bacterial growth. *Journ. of Hygiene*, 1914, 14, p. 242.
295. LEGROUX (R.) et ELIAVA (G.). — Sur un liquide où se maintient invariable le nombre de bactéries des cultures. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, 1921, 35, p. 713.
296. LEISHMAN. — *Journ. Roy. Inst. Publ. Health*, London, 1901, 18, No 8, p. 461 (d'après GLYNN).
297. LEITNER (N.). — Der Einfluss von Elektrolyten auf die bakterizide Wirkung von Kupfer- und Silbersalzen. Die Abhängigkeit der bakteriziden Wirkung von der elektrostatischen Ladung der Bakterien. *Biochem. Ztschr.*, 1930, 221, p. 42.
298. LEONE (C.). — *Arch. für Hyg.*, 1886, 4, p. 168 (d'après WINSLOW)

- 298 bis. LEPIERRE (Ch.). — Rôle prépondérant du cadmium, du glucinium, du cuivre dans le développement de l' « *Aspergillus niger* ». *Bull. Soc. portug. sc. nat.*, Lisbonne, 1912, 6, p. 10.
299. LEPIERRE (Ch.). — Sur la non-spécificité du zinc comme catalyseur biologique pour la culture de l' « *Aspergillus niger* ». Son remplacement par d'autres éléments. *C. R. As. Sc.*, 1913, 156, p. 258, 409 et 1179.
- 299 bis. LEPIERRE (Ch.). — Inutilité du zinc pour la culture de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1913, 157, p. 876.
300. LÉVY (M^{lle} G.). — Étude de l'influence de l'aluminium sur le développement du « *Sterigmatocystis nigra* ». *Bull. Soc. Chimie Biol.*, 1932, 14, p. 745.
301. LIEBIG. — *Ann. de Phys. et de Chim.*, 1870.
302. LIEBRFICH. — Eine Zählkammer für cytologische und bacteriologische Zwecke. *Deutsch. med. Wochenschrift.*, 1916.
303. LINOSSIER (G.). — Sur une hématine végétale : l' « aspergilline », pigment des spores de l' « *Aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1891, 112, p. 489.
304. LINOSSIER (G.). — Sur une hématine végétale : l' « aspergilline ». *C. R. Ac. Sc.*, 1891, 112, p. 807.
305. LINOSSIER (G.). — Sur la biologie de l' « *oïdium lactis* ». Alimentation minérale. *C. R. Soc. Biol.*, 1917, 80, p. 332.
- 305 bis. LINOSSIER (G.). — Sur la biologie de l' « *oïdium lactis* ». Influence de la quantité des aliments minéraux sur le développement du champignon. *C. R. Soc. Biol.*, 1917, 80, p. 433.
306. LIOT (A.). — Culture du bacille pyocyanique sur milieux chimiquement définis. *Th. Dipl. Pharm. Sup.*, Imprimerie de la Cour d'Appel, Paris, 1923.
307. LISBONNE (M.) et SEIGNEURIN (R.). — Sur l'électrophorèse des « *Brucella* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1933, 196, p. 1747.
308. LOER (M. van). — Die Wirkung des Kupfers auf die Hefe. *Ann. Zymol. (Bruxelles)*, 1934, 1, p. 287.
309. LORTET (L.). — Influence des courants induits sur l'orientation des bactéries vivantes. *C. R. Ac. Sc.*, 1896, 122, p. 892.
310. LOTKA (A. J.). — Elements of Physical Biology, 1925 (d'après BUCHANAN).
311. LOTTERMOSER (A.). — Optische Untersuchungen über die Fällung der Wolframsäure durch Säuren aus Natriumwolframatlösungen. *Kolloid Ztschr.*, 1914, 15; p. 145.
312. LUHRIG (H.) et SARTORI (A.). — Gärungshemmungen Zuckerkhaltigen Lösungen durch Konservierungsmittel. *Pharm. Zentralblatt*, 1908, 49, p. 934.
313. LUMIÈRE (A.) et CHEVROTIER (J.). — Société de Thérapeutique, 28 mai 1913, p. 309.

314. LUSTIG (F.). — Numération des colonies microbiennes sur boîtes de Petri. *Bull. des Biologistes pharmaciens*, 1933, p. 204.
315. MADSEN (T.) et NYMAN (M.). Zur Theorie Desinfektion. *Ztschr. f. Hyg. u. Inf. Krank.*, 1907, 57, p. 388.
317. MARBOE (F.). — Über den Einfluss blanker Metalle auf Hefe. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, II Abt., 1930, 81, p. 67.
318. MAC INNES (D. A.) et BRIGHTON (T. B.). — The moving-boundary method for determining transference numbers. III A novel form of apparatus. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1925, 47, p. 994.
319. MARTIN (P.). — Action « in vitro » de certains sels d'or sur le bacille de Koch cultivé en milieu liquide (milieu de Korchner). *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 115, p. 45.
320. MEIER (R.). — Über « Reizwirkungen » an Einzelzellen. *Biochem. Ztschr.*, 1926, 174, p. 385 (d'après A. NIETHAMMER).
321. MEILLÈRE (G.) et DE SAINT-RAT. — Dosage de l'azote total. Disposition pour recueillir l'ammoniaque. Application au dosage des albumines du lait. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1922, 25, p. 100.
322. MESTREZAT (W.). — Formol-titration des acides aminés en solution aqueuse ou dans l'urine. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1919, 1, p. 107.
323. METALNIKOFF. — Pouvoir bactéricide de l'eau soumise à l'action combinée de l'argent métallique et du courant continu électrique. *C. R. Ac. Sc.*, 1935, 201, p. 411.
324. MICHAELIS (L.) et MARCORA (F.). — Die Säure produktioität des Bacterium coli. *Ztschr. für Immunitätforschung und exp. Therapie*, 1912, 14, p. 170-173.
325. MICHAELIS (L.) et DAMBICEANU (A.). — Untersuchungen über die Kataphorese des Mastixsols. *Koll. Ztschr.*, 1924, 34, p. 322.
326. MICHAELIS (L.). — Elektrische Überführung von Fermenten. *Biochem. Ztschr.*, 1909, 16, p. 81.
327. MICHAELIS (L.). — Praktikum der physikal. Chem., III. Berlin, Springer, 1926.
328. MICHAELIS (L.). — Electriche Überführung von Fermenten. *Biochem. Ztschr.*, 1909, 16, p. 81.
329. MILLER. — Einige kurze Notizen in Bezug auf bakteriologische Untersuchungsmethoden. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1894, 15, p. 894.
330. MILLER (W. I.). — Toxicity and chemical Potential. *Journ. of Phys. Chem.*, 1920, 24, p. 562.
331. MIQUEL (P.). — Nouvelles recherches sur les poussières organisées de l'atmosphère. *Annuaire de l'Observatoire de Montsouris*, 1880, 9, p. 386.

332. MIQUEL (P.). — Instructions relatives à l'analyse micrographique des eaux. *Revue d'hygiène*, 1887, 9, p. 725.
333. MIQUEL (P.). — Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux, 1 vol., Paris, Gauthier-Villars, 1891.
334. MOLISCH (H.). — Die Pflanzen in ihren Beziehungen zum Eisen, Iena, 1892.
335. MOLISCH (H.). — Die mineralische Nahrung der niederen Pilze. Sitzungsber. d. Akad. d. Wissensch., Wien, 1894 (d'après A. NIETHAMMER).
336. MOLLIARD (M.). — Nutrition de la plante, 1927, tome I, Doin, édit., Paris, p. 73.
337. MOND (R.) et HOFFMANN. — *Pflüger's Arch.*, 1928, 219, p. 467, et 1928, 220, p. 194.
338. MOORE (B.) et HAWKES (J. L.). — An investigation of the toxic actions of dilute solutions of the salts of certain heavy metals upon the *Bacillus typhosus*, with a view to practical application in the purification of shell fish. *The Bio. Chem. Journ.*, 1908, 3, p. 313.
339. MORCHOISNE (J.). — Des qualités bactériologiques de diverses peptones. *Th. Doct. en Pharmacie*, Paris, Vigot frères, éditeurs, 1935.
340. MOUSSALI (A.). — Action de quelques terres rares sur le bacille pyocyanique et les bacilles de la dysenterie. *Th. Doct. en Pharm.*, Nancy, 1919.
341. MUELLER (J. H.). — Studies on cultural requirements of bacteria. IV. Quantitative estimation of bacterial growth. *Journ. of Bact.*, 1935, 29, p. 383.
342. MUKHERJEE (J.). — Sources of Error in the Measurement of the Electrical Charge of Colloidal Particles by the Method of Moving Boundaries : an Improved Method based on a Direct Measurement of the Potential Gradient across the Boundary. *Proc. Roy. Soc. London, A*, 1923, 103, p. 102.
343. MULLER (Max). — Über den Einfluss von Fiebertemperaturen auf die Wachstumsgeschwindigkeit und die Virulenz des Typhus Bacillus. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, 20, p. 245.
344. MUNTNER (S.). — Über Bakterienzählung und -grössenmessung in Aufschwemmungen (insbesondere Vaccinen) mittels des Kleinmannschen Nephelometers. *Ztschr. für Hygiene*, 1926, 106, p. 50.
345. MUNTSCHE (O.). — Ein Beitrag zur kulturellen Keimzählmethode. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1929, 114, p. 438.
346. NAEGELI (C. von). — Über oligodynamische Erscheinungen in lebenden Zellen. Neue Denkschriften der allgem. schweiz. Gesellsch. f. d. ges. Naturwiss., 1893, 33, p. 23.
347. NAEGELI et SCHWENDENER. — Das Mikroskop, zweite Aufl., 1877, p. 640 (d'après BÜCHNER).

348. NEERGARD (Van). — Experimentelles zur intravenösen Silbertherapie. *Arch. exp. P. und P.*, 109, p. 164.
349. NEISSER (Max). — Die mikroskopische Plattenzählung und ihre spezielle Anwendung auf die Zählung von Wasserplatten. *Ztschr. für Hygiene*, 1895, 20, p. 118.
350. NEISSER (M.) et EICHBAUM (F.). — Die oligodynamische Metallwirkung in Theorie und Praxis. *Erg. Hyg.*, 1932, 13, p. 170.
351. NEISSER (M.) et FRIEDMANN (U.). — Studien über Ausflockungsercheinungen. II. Beziehungen zur Bakterienagglutination. *Münch. med. Woch.*, 1904, 51, p. 465 et 827.
352. NICLOUX (M.). — Microdosage du carbone. Application à la détermination du carbone urinaire. *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, 9, p. 639.
353. NINIC et MOLINARY. — Vaccinale et curativo coi filtrati batterici. *Ann. d'Igiene*, 1928, 38, p. 196-217.
354. NIETHAMMER (A.). — Zur Frage des Lichttreibens. *Biochem. Ztschr.*, 1926, 177, p. 418.
355. NIETHAMMER (A.). — Die Stimulationswirkung von Giften auf Pilze und das Arndt-Schulzche Gesetz. *Biochem. Ztschr.*, 1927, 184, p. 370.
356. NIETHAMMER (A.). — Studien über die Beeinflussung der Pflanzenzelle durch Schwermetallverbindungen. *Protoplasma*, 1931, 12, p. 554.
357. NOELDECHEN. — *Kühn's Archiv.*, 1926, 9, p. 264 (d'après A. NIETHAMMER).
358. NORTHROP (J. H.). — The stability of bacterial suspensions. I. A convenient cell for microscopic cataphoresis experiments. *Journ. Gen. Phys.*, 1922, 4, p. 629.
- 358 bis. NORTHROP (J. H.) et CULLEN. — *Journ. gen. Physiol.*, 1922, 4, p. 635.
359. NORTHROP (J. H.) et KRUIF (P. H. de). — The stability of bacterial suspensions. II. The agglutination of the bacillus of rabbit septicemia and of *Bacillus typhosus* by electrolytes. *Journ. gen. of Physiol.*, 1921-1922, 4, p. 639.
360. OETTEL (W.). — Reiz und Hemmungswirkungen von Silber und Formaldehyd auf das Bakterienwachstum, nebst Beobachtungen über Wachstumskurves überhaupt. *Arch. Hyg. Bakteriolog.*, 1934, 113, p. 71.
361. OLITZKI (L.). — Electric charge of bacteria sensitized with purified agglutinins. *Journ. of Immun.*, 1934, 27, p. 105.
- 361 bis. ONO (N.). — Über die Wachstumsbeschleunigung einiger Algen und Pilze durch chemische Reize. *Journ. College of Science Tokyo.*, 1899, 13, p. 141.
362. ONO (N.). — Zur Frage der chemischen Reizmittel. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, II Abt., 1902, 9, p. 154.

363. PAINE (S.). — The permeability of the yeast-cell. *Proc. Roy. Soc. of London*, B, 1911-1912, 84, p. 289-307.
364. PASTEUR (L.). — Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Ann. Ch. physique*, 3^e série, 1860, 58, p. 323.
365. PAUL (Th.) et KRONIG (B.). — Über das Verhalten der Bakterien zu chemischen Reagentien. *Ztschr. physikal. Chem.*, 1896, 21, p. 414.
366. PAULI (W. O.) et ENGEL (L.). — Die Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit von Kolloiden in Elektrischen Felde. *Ztschr. phys. Chem.*, 1927, 126, p. 247.
367. PENFOLD (W. J.). — On the nature of bacterial lag. *Journ. of Hygiene*, 1914, 14, p. 215.
368. PENFOLD (W. J.) et NORRIS. — The relation of concentration of food Supply to the generation time of Bacteria. *Journ. of Hygiene*, 1912, 12, p. 527.
369. PERRIN (J.). — *Journal de Chimie Physique*, 1904-1905, et notice sur travaux (1918).
370. PESCH (K. L.). — Das Kolonoscop ein Projektions apparat für Kolonienzählung in Plattenkulturen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1931, 120, p. 254 et 282.
371. PETIT (J.). — Sur les peptones. *Journ. Pharm. et Chim.*, 1881, 3, p. 529.
372. PFEFFER (W.). — *Pflanzenphysiologie* : I. Auflage, 1880 ; II. Auflage, 1887.
373. PICTON (H.) et LINDER (S. E.). — Solutions and Pseudo-solutions. *Journ. Chem. Soc.*, 1892, 61, p. 148 ; 1895. 67 p. 63, et 1897, 71, p. 568.
374. PIRSCHLE (K.). — Vergleichende Untersuchungen über die physiologische Wirkung der Elemente nach Wachstumsversuchen mit « *Aspergillus niger* » (Stimulation und Toxizität). *Planta*, 1934, 23, p. 177.
375. PLOTZ (H.). — Sur la filtrabilité du bacille tuberculeux. *C. R. Ac. Sc.*, 1934, 199, p. 387.
376. POPOFF. — *Pflüger's Archiv f. d. ges. Physiol.*, 1875.
377. POPOFF. — *Zellstimulation*. Parey, édit., Berlin, 1931, p. 192.
378. PORCELLI-TITONE. — *Reforma medica*, 31, N° 42 (d'après F. VLES).
379. PRAUSNITZ (C.). — Einstellung der Stärke der Impfstoffe, in Kolle Krause u. Uhlenhuth, 1930, 3, 1, p. 534-541.
380. PRINGSHEIM (E. G.). — Über den Einfluss der Nährstoffmenge auf die Entwicklung der Pilze. *Zeitschr. f. Bot.*, 1914, 6, p. 577.
- 380 bis. PRINGSHEIM (E. G.). — Über Plasmolyse durch Schwermetallsalze. *Beihette z. Bot. Centralb.*, 1924, 41, p. 1.

381. PROUST. — *Revue d'hygiène et de police sanitaire*, 1884 (d'après NEISSER).
382. PULST. — Die Widerstandfähigkeit einigen Schimmelpilze gegen Metallgifte. *Jahr. f. Wissenseh. Bot.*, 1902, 37, p. 205.
383. PUSCHEL (J.). — Die oligodynamische Wirkung als Fehlerquelle beim bakteriologischen Arbeiten. *Klin. Wochenschr.*, 1933, 2, p. 1333.
384. PUTTER (E.). — Untersuchungen über Bakterienkataphorese. *Ztschr. Immunitätsforsch., Orig.*, 1921, 32, p. 538.
385. RABINOWITCH (A.) et FODIMAN (E.). — Zur Methodik kataphoretischer Messungen. *Kolloid. Ztschr.*, 1932, 59, p. 310.
386. RADOEFF (A.). — Stimulation de la croissance par des sels minéraux, des colorants vitaux et divers composés organiques chez le riz. *C. R. Soc. Biol.*, 1932, 110, p. 955.
387. RAHN (O.). — Über den Einfluss der Stoffwechsel produkte auf das Wachstum der Bacterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, II Abt., 1906, 16, p. 417 et 609.
388. RAULIN (J.). — Études chimiques sur la végétation des Mucédinées, particulièrement de l' « *Ascophora nigrans* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1863, 57, p. 228.
389. RAULIN (J.). — Études chimiques sur la végétation. *Ann. Sc. nat. Bot.*, série 5, 1869, 11, p. 91.
390. RAULIN (J.). — Études chimiques sur la végétation. *Th. doct. ès sc.*, Paris, 1870.
391. REED (H. S.) et REYNOLDS (R. R.). — *Techn. Bull.*, 10, Va. Agric. Exper. Sta., 1916 (d'après WINSLOW).
392. RÉGNARD (P.). — Appareil destiné à enregistrer sous forme de courbe continue les phénomènes de la fermentation. *C. R. Soc. Biol.*, 1882, 4, p. 459.
393. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (M^{lle} S.). — Introduction à l'étude des antiseptiques. Étude numérique du croît d'un bacille pyocyanique dans un milieu de culture liquide. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1927, 34, p. 401 et 490.
394. RÉGNIER (J.) et KAPLAN (M^{me} A.). — Contribution à l'étude numérique de la multiplication microbienne. *C. R. Ac. Sc.*, 1932, 194, p. 323.
395. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (M^{lle} S.). — De la méthode de numération microbienne basée sur le dénombrement des colonies développées sur milieux solidifiés. Les dilutions de la suspension initiale sont-elles à rejeter? *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 114, p. 983.
396. RÉGNIER (J.) et LAMBIN (M^{lle} S.). — Contribution à l'étude des méthodes de numération des microbes. Dénombrement des colonies développées sur milieux nutritifs solidifiés. *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1934, 36, p. 7.

397. RÉGNIER (J.), DAVID (R.) et MORCHOISNE (J.). — De l'influence du glucose et des éléments minéraux sur la multiplication du bacille pyocyanique. *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, p. 415.
- 397 bis. RÉGNIER (J.), DAVID (R.) et MORCHOISNE (J.). — Influence de la constitution des peptones sur la multiplication du bacille pyocyanique, *C. R. Soc. Biol.*, 1935, 120, p. 415.
398. REIMESCH (E.). — Zur Frage der quantitativen Bestimmung von Mikroorganismen nebst einer neuen diesbezüglichen allgemeinen Bestimmungs-méthode. *Centralblatt f. Bakt. u. Par.*, II abt., 1935, 91, p. 460.
399. RENARD. — *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 652 (d'après G. THIRY).
400. RETTGER (Lee T.). — The science of bacteriology and its relation to other science. *Journ. of. Bact.*, 1918, 3, p. 203.
401. RICHARDS (M.). — Die Beeinflussung des Wachstums einiger Pilze durch chemische Reize. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 1897, 30, p. 665.
402. RICHARDS (O. W.). — The stimulation of yeast growth by thallium, a « bios » impurity of asparagine. *Journ. of biol. Chem.*, 1932, 96, p. 405.
403. RICHET (Ch.) et CARDOT (H.). — Influence d'élévations thermiques faibles et brèves sur la marche des fermentations. *C. R. Ac. Sc.*, 1916, 163, p. 954.
404. RICHET (Ch.). — De l'action de quelques sels métalliques sur la fermentation lactique. *C. R. Ac. Sc.*, 1892, 114, p. 1494.
405. RICHET (Ch.) et CHASSEVANT (A.). — De l'influence des poisons minéraux sur la fermentation lactique. *C. R. Ac. Sc.*, 1893, 117, p. 673.
406. RICHET (Ch.). — Des doses accélérantes des sels de magnésium dans la fermentation lactique. *C. R. Soc. Biol.*, 1902, 54, p. 1436.
407. RICHET (Ch.). — De l'action des métaux à faibles doses sur la fermentation lactique. *C. R. Soc. Biol.*, 1905, 58, p. 455.
408. RICHET (Ch.). — De l'action des doses minuscules de substances sur la fermentation lactique. *C. R. Soc. Biol.*, 1905, 58, p. 981.
409. RICHET (Ch.). — De l'action stimulante des sels de magnésium sur la fermentation lactique. *C. R. Ac. Sc.*, 1915, 161, p. 264.
410. RICHTER (A.). — Zur Frage der chemischen Reizmittel. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, II Abt., 1901, 7, p. 417.
411. ROBERT (Leop.). — Diaphanomètre. *C. R. Soc. Biol.*, 1921, 84, p. 820.
412. ROBERG (H.). — Über die Wirkung von Eisen =, Zink = und Kupfersalzen auf Aspergillen. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, II Abt., 1928, 74, p. 333.
413. ROBERTSON (T. B.). — Reproduction in cell-communities. *Journ. of physiology*, 1922, 56, p. 403.

414. ROBERTSON (T. B.). — Experimental studies on cellular multiplication. The multiplication of isolated infusoria. *Biochem. Journ.*, 1921, 15, p. 595.
415. ROSENOW (E. C.). — Vitesse de cataphorèse des streptocoques isolés dans les recherches sur les arthrites. *Presse Médicale*. 1933, N° 82.
416. RUATA (G.). — Quantitative Analyse bei der bakteriologischen Diagnose der Wässer *Centralblatt für Bakt. une Par.*, 1904, 11 Abt., 11, p. 220 et 287.
417. RUHLAND (W.). — Zur Kritik der Lipoid- und der Ultrafiltertheorie der Plasmahaut nebst Beobachtungen über die Bedeutung der elektrischen Ladung der Kolloide für ihre Vitalaufnahme. *Biochem. Ztschr.*, 1913, 54, p. 59.
418. RUHLAND (W.). — Beiträge zur Physiologie der Knallgasbakterien. *Jahrb. f. wiss. Bot.*, 1924, 63, p. 321.
419. RUSS (C.). — The electrical reactions of certain bacteria, and an application in the detection of tubercle bacilli in urine by means of an electric current. *Proc. Roy. Soc. London. Series B*, 1909, 81, p. 314.
420. SABOURAUD. — Méthode de Sabouraud pour la préparation des vaccins staphylococciques (d'après CALMETTE, NÈGRE et BOQUET, p. 531).
421. SALIMBENI. — Méthode de numération à l'hématimètre (d'après CALMETTE, NÈGRE et BOQUET, 3^e édit., p. 858).
422. SALUS (G.). — Die Bakterienadsorption durch Bolus. *Biochem. Ztschr.*, 1917, 84, p. 378.
423. SARAFANOFF (W.). — Über die Messung des Hefewachstum mit Hilfe des Colorimeters. *Arch. biol. Naouk.*, 1934, 35, p. 309.
424. SARTORY (A.) et BAILLY (P.). — Action de quelques sels de terres rares sur les cultures d'« *Aspergillus fumigatus* ». *C. R. Soc. Biol.*, 1920, 84, p. 361.
425. SAUTON (B.). — Influence du fer sur la fermentation des spores de l'« *aspergillus niger* ». *C. R. Ac. Sc.*, 1910, 151, p. 241 et *Soc. Biol.*, 1911, 71, p. 589.
- 425 bis. SAUTON (B.). — Influence du fer sur la culture de quelques moisissures. *Ann. Inst. Past.*, 1911, 25, p. 922.
426. SAUTON (B.). — Sur la nutrition minérale du bacille tuberculeux. *C. R. Ac. Sc.*, 1912, 155, p. 860.
427. SAUTON (B.). — Sur l'action antiseptique de l'or et de l'argent. *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 1268.
428. SAXL (P.). — Zur Fernwirkung des Silbers u. s. w. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1917, 30.
429. SCHMIDT (H.). — Zur Frage der Einwirkung von Kochsalzlösung auf Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1924, 91, p. 510.

430. SCHMIDT (P.). — Physikalisch-chemische Untersuchungen über die Serum-Agglutination, *Arch. f. Hyg.*, 1913, 80, p. 62.
431. SCHULZ. — *Ref. Just. Jahresber*, 1877, 5, p. 84.
432. SCHULZ (H.). — Zur Lehre von der Arzneiwirkung. *Virchow's Archiv.*, 1877, 108, p. 427.
433. SCHULZ (H.). — *Pflügers Archiv. für d. ges. Physio.*, 1888, 42, p. 517.
434. SCHULZ (H.). — Unorganische Arzneistoffe, 1907.
435. SCHULZ (H.). — Ein Apparat zur graphischen Darstellung von Gärungsvorgängen. *Pflügers Archiv. für d. ges. Phys.*, 1907, 120, p. 51.
436. SCHWARTZ (W.) et STEINHART (H.). — Untersuchungen über die oligodynamische Wirkung des Kupfers. *Arch. Mikrobiol.*, 1933, 4, p. 301.
437. SCHWEINBURG (F.). — Versuche zur Erklärung der Antivirusswirkung. *Wien. Klin. Wochenschr.*, 1928, 52, p. 41.
438. SCOTT (T.), BODLEY et SCOTT (G.) BODLEY. — A record of the treatment of bacterial infections by autogenous vaccines. *Lancet*, 1912, 2, p. 879.
439. SEIGNEURIN (R.). — Recherches sur la conductibilité et l'électrophorèse des suspensions microbiennes. *Th. Doct. en Méd.*, Montpellier, 1935.
440. SELIBER (G.) et KATZNELSON (M^{lle}). — Sur l'influence de la composition du milieu sur la valeur osmotique de la cellule de levure. *C. R. Soc. Biol.*, 1927, 97, p. 449 et p. 515.
441. SELTER (H.). — Infektionsversuche mit kleinen Tuberkelbakterienmengen mit besonderer Berücksichtigung des Inhalationsweges. *Deut. med. Woch.*, 1916, p. 593.
442. SENDERLING (Y.). — On the continuous oligodynamic effect of elements on bacteria. *Duodecim, A*, 1933, 16 (N° 8), p. 126.
443. SHEARER (C.). — The action of electrolytes on the electrical conductivity of the bacterial cell and their effect on the rate of migration of these cells in an electric field. *Proc. Cambridge Phil. Soc.*, 1919, 19, p. 263.
444. SHEARER (C.). — Studies on the action of electrolytes on bacteria. Part II. The influence of the trivalent positive salts on the rate of migration of bacteria in an electric field, and their effect on growth and virulence of pathogenic organisms. *Journ. Hyg.*, 1922, 21, p. 77.
445. SHEARER (C.). — Studies on the action of electrolytes on bacteria. I. The action of monovalent and divalent salts on the conductivity of bacterial emulsions. *Journ. Hyg.*, 1919-1920, 18, p. 337.
446. SHERMAN (J. M.), HOLM (G. E.) et ALBUS (W. R.). — Salt effects in bacterial growth. III. Salt effects in relation to the lag period and velocity of growth. *Journ. of Bacterio.*, 1922, 7, p. 568.

447. SHERMAN (J. M.) et ALBUS (W. R.). — Physiological youth in bacteria. *Journ. of Bact.*, 1923, 8, p. 127.
448. SHERMAN (J. M.) et ALBUS (W. R.). — The function of lag in bacterial cultures. *Journ. of Bact.*, 1924, 9, p. 303.
449. SHERMAN (J. M.) et HOLM (G. E.). — Salt effects in bacterial growth. *Journ. of Bacterio.*, 1921, 6, p. 511 et 1922, 7, p. 465.
450. SHAUGHNESSY (H. J.). — *Diss., Yale Univ. Libr.*, 1926.
451. SIMONINI (A.). — Ueber die Einwirkung seltener Erden auf Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1914, 74, p. 343.
452. SIMONINI (A.). — Über die Einwirkung seltener Erden auf Bakterien. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1915, 75, p. 399.
453. SLATOR (A.). — The rate of fermentation by growing yeast cells. *Biochem. Journ.*, 1913, 7, p. 197.
454. SLATOR (A.). — A note on the lag phase in the growth of microorganisms. *Journ. Hygiene*, 1917, 16, p. 100.
455. SLATOR (A.). — Yeast crops and the factors which determine them. *Journ. of chem. Soc.*, 1921, 119, p. 115.
456. SMITH (Graham). — The behaviour of bacteria in fluid cultures as indicated by daily estimates of the numbers of living organisms. *Journ. of Hygiene*, 1920, 19, p. 133.
457. SOMMER (H.). — Die Keimzählung von Bakterienimpfstoffen auf mikroskopischem Wege. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1923, 90, p. 468.
458. SORU (M^{lle} E.). — Signe de la charge électrique du vibron cholérique normal, de l'agglutinine correspondante et du vibron sensibilisé. *C. R. Soc. Biol.*, 1928, 99, p. 430.
459. SORU (M^{lle} E.). — Signe de la charge électrique des bacilles typhiques et du bacille tumefaciens normaux et sensibilisés ainsi que de leurs agglutinines spécifiques. *C. R. Soc. Biol.*, 1929, 100, p. 904.
460. SORU (M^{lle} E.). — Le potentiel électrique de quelques espèces de vibrions cholériques. *C. R. Soc. Biol.*, 1934, 115, p. 1319.
461. SPIRO (K.). — Die oligodynamische Wirkung des Kupfers. *Biochem. Ztschr.*, 1916, 74, p. 265.
462. STEARNS (E. W.) et STEARNS (A. E.). — The chemical mechanism of bacterial behavior. *Journ. of Bact.*, 1924, 9, p. 479.
463. STEARNS (E. W.) et STEARNS (A. F.). — A study of the chemical differentiation of bacteria. *Journ. of Bact.*, 1925, 10, p. 13.
464. STEIN (M. F.). — The interpretation of B. coli test results on a numerical and comparative basis as applied to the investigation of water and sewage. *Journ. of Bact.*, 1919, 4, p. 243.

465. STEINBERG. — A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of « *Aspergillus niger* ». *Amer. Journ. of Bot.*, 1919, 6, p. 330.
466. STEINER (M.). — Ueber eine neue Bakterienzählkammer. Ein Beitrag zur Methodik der direkten Keimzahlermittlung. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1929, 113, p. 306.
467. STEPHENSON (M.). — Bacterial Metabolism. London, Green and Co, 1930.
468. STEVENS (F. L.). — The effect of aqueous solutions upon the germination of fungus spores. *Bot. gaz.*, 1898, 26, p. 377.
469. STOKLASA (J.). — De l'importance physiologique du manganèse et de l'aluminium sur la cellule végétale. *C. R. As. Sc.*, 1911, 152, p. 1340.
470. STOKLASA (J.). — Influence de l'uranium et du plomb sur la végétation. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, 156, p. 153.
471. STRAUSS. — *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 652 (d'après G. THIRY).
472. SUPFLE (K.). — Bakteriologische Untersuchungen über die Gültigkeit dessog. Arndt-Schulz'schen biologischen Grundgesetzes. *Münch. Med. Wochenschr.*, 1922, 25, p. 920.
473. SVEDBERG (The) et TISELIUS (A.). — A new method for determination of the mobility of proteins. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1926, 48, p. 2272.
474. SZENT-GYÖRGYI (A. von). — Kataphoreseversuche an Kleinlebewesen. Studien über Eiweissreaktionen. III. *Biochem. Ztschr.*, 1921, 113, p. 29.
475. TALENTI (M.) et LEONARDI (D.). — Sulla cataforesi batterica. *Ann. Igiene*, 1935, 45, p. 109.
476. TEAGUE (O.) et BUXTON (B. H.). — Die Agglutination in physikalischer Hinsicht. III. Die von den suspendierten Teilchen getragene elektrische Ladung. *Ztsch. physik. Chem.*, 1907, 57, p. 76.
477. THEORELL (H.). — Ein neuer Kataphoreseapparat für Untersuchungen. Zwecke. *Biochem. Ztschr.*, 1935, 275, p. 1.
478. THIELE et WOLF. — *Arch. f. Hyg.*, 1899, 34.
479. THIRY (G.). — De faibles doses d'antiseptiques exaltent la virulence et les fonctions des microorganismes. *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 652.
480. THIRY (G.) et COLAS. — *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 652 (d'après G. THIRY).
481. THIRY (G.) et HUMBERT. — *C. R. Soc. Biol.*, 1913, 74, p. 652 (d'après G. THIRY).
482. THONI (J.) et THAYSEN (A. C.). — Experimentelle Untersuchungen zur Feststellung der Mindestzahl von Bacillen, die Beim Meerschweinchen noch Tuberkulose hervorruft. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1915-1916, 77, p. 308.

483. THORNTON (W. M.). — The opposite electrification produced by animal and vegetable life. *Proc. Roy. Soc., London, Series B*, 1909-1910, 82, p. 638.
484. THUMAS et HOFFMANN. — *C. R. Soc. Biol. Saint-Petersbourg*, 1893.
486. TITSLER (R. P.) et LISSE (M. W.). — The relation between electrical charge and the agglutination ability of *Salmonella pullorum*. *Journ. of Bacterio.*, 1928, 15, p. 105.
487. TODD (Ch.). — *Brit. J. exp. path.*, 1927, 8, p. 369.
488. TRÉSTER. — Verfahren zum Zählen abgetöteter Bakterien in Aufschwemmungen. *Centrablatt für Bakt. und Par., Originale*, 1922, 88, p. 252.
489. URBAIN (A.) et GORET (P.). — Action des sels de terres rares sur le développement « in vitro » de *Brucella abortus* Bang ». *C. R. Soc. Biol.*, 1933, 112, p. 36.
490. VALLEY (G.) et RETTGER (L. F.). — The influence of carbon dioxide on bacteria. *Journ. of Bact.*, 1927, 14, p. 101.
491. VARVARO (U.). — Influence du bioxyde de manganèse et d'autres combinaisons métalliques sur le développement des semences. *Staz. sperim. agrar. ital.*, 1913, 45, p. 917.
492. VINCENT (H.). — *Revue d'Hygiène*, 17^e année, 1895, p. 693.
493. VLÈS (F.). — Recherches sur quelques propriétés optiques des suspensions biologiques et leur application à l'opacimétrie bactérienne. *Arch. de physique biologique*, 1921, 1, p. 189.
494. VLÈS (F.). — Sur la signification des dosages bactériens. *C. R. Soc. Biol.*, 1919, 82, p. 373.
- 494 bis. VLÈS (F.). — *Précis de Chimie physique*, 1929.
495. WAMOSCHER. — Bakterienzählung im Dunkelfeld. *Klim-Woch.*, 1927.
496. WARBURG (O.). — Physikalische Chemie der Zellatmung. *Biochem. Ztschr.*, 1921, 119, p. 134.
497. WATERMANN (H. J.). — Kgl. Akad. Amsterdam, 1912.
498. WEAVER (R. H.). — Studies on *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* (II Electrophoresis Studies). *Journ. of Bacterio.*, 1932, 24, p. 73.
499. WEHMER (K.). — Zur Frage nach dem Wert der einzelnen Mineral-substanzen für Pilze. *Ber. Dtsch. Bot. Ges.*, 1895, 13, p. 257.
500. WEICHARDT (W.). — Über das sogenannte Antivirus von Besredka. *D. med. Wochenschr.*, 1927, 53, p. 1333.
501. WHIPPLE (G. C.). — *Tech. Quart.*, 1901, 14, p. 21 (d'après WINSLOW).
502. WHITNEY (W. R.) et BLAKE (J. C.). — The migration of colloids. *Journ. Amer. Chem. Soc.*, 1904, 26, p. 1339.

503. WIKULLIL (L. von). — Zur Bestimmung der Keimzahl bakterieller Impfstoffe. *Centralblatt f. Bakt. und Par.*, Originale, 1926, 100, p. 379.
504. WILSON (G. S.). — The proportion of viable bacteria in young cultures with especial reference to the technique employed in counting. *Journ. of Bact.*, 1922, 7, p. 405.
505. WINSLOW (C. E. A.). — The Rise and Fall of Bacterial Populations in the N. knowledge of bact. and im., de Jordan et Falk, chap. VI, p. 58.
506. WINSLOW (C. E. A.). — The influence of cations upon bacterial viability. *Quart. Rev. Biol.*, 1934, 9, p. 259.
508. WINSLOW (C. E. A.) et FALK (I. S.). — Studies on salt action. VIII. The influence of calcium and sodium salts at various hydrogen ion concentration upon the viability of « *Bacterium coli* ». *Journ. of Bacterio.*, 1923, 8, p. 215.
509. WINSLOW (C. E. A.) et BROOKE (O. R.). — The viability of various species of bacteria in aqueous suspensions. *Journ. of Bact.*, 1927, 13, p. 235.
510. WINSLOW (C. E. A.) et DOLLOFF. — Relative importance of additive and antagonistic effects of cations upon bacterial viability. *Journ. of Bact.*, 1928, 15, p. 67.
511. WINSLOW (C. E. A.), FALK (I. S.) et CAULFIELD (M. F.). — Electrophoresis of Bacteria as influenced by hydrogen ion concentration and the présence of sodium and calcium salts. *Journ. gen. of Physiol.*, 1923-1924, 6, p. 177.
512. WINSLOW (C. E. A.) et FLEESON (E. H.). — The influence of electrolytes upon the electrophoretic migration of bacteria and of yeast cells. *Journ. Gen. Physiol.*, *Jacques Loeb Memorial Volume*, 1926, 8, p. 195.
513. WINSLOW (C. E. A.) et SHAUGHNESSY (H. J.). — The alkaline isopotential point of the bacterial cell. *Journ. of gener. Physiol.*, 1924, 6, p. 697.
514. WINSLOW (C. E. A.) et SHAUGHNESSY (H. J.). — The migration of Bacteria in the electrical field. *Abstr. of Bact.*, 1924, 8, p. 5.
515. WINSLOW (C. E. A.) et UPTON (M. F.). — The electrophoretic Migration of various types of vegetable cells. *Journ. of Bact.*, 1926, 11, p. 367.
516. WOHLFEIL (T.). — Vergleichende Untersuchungen zwischen der mikroskopischen Auszählung im Dunkelfeld, dem Platten-guszverfahren und der Trockensubstanzbestimmung. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, 1933, 127, p. 492.
517. WOLFF (J.). — Sur l'action catalytique du fer sur le développement de l'orge. *C. R. Ac. Sc.*, 1913, 157, p. 1476.
518. WOLMAN (A.) et WEAVER (H. L.). — A modification of the Mac Crady method of the numerical interpretation of fermentation tube results. *Journ. of inf. Diseases*, 1917, 21, p. 287.

519. WRIGHT (A. E.). — On some new procedures for the examination of the blood and of bacterial cultures. *The Lancet, London*, 1902, 2, p. 11.
520. WRIGHT (A. E.). — Technique of the Test and Capillary glass tube London, Constable and Co, 1912.
521. WRIGHT (M^{lle}). — Zeitschr. f. Elektrochem., 1928, 34, p. 298 (d'après FREUNLICH et SÖLLNER).
522. YASUDA (Morio). — Über das Wesen der Salzhydrolyse, betrachtet im Lichte der Salzwirkung auf die Bakterienentwicklung. *Journ. of Biochem.*, 1929, 10, p. 259.
523. ZEISZLER (J.). — Binokulares Plattenkulturmikroskop. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1922, 88, p. 430.
524. ZELIKOW (J.). — Quantitative Bestimmung der Bakterialmasse durch die kolorimetrische Methode. *Centralblatt für Bakt. und Par.*, Originale, 1906, 42, p. 570.
525. ZELLER (H.). — Wirkung von Arzneimitteln und Strahlen auf Hefe. *Biochem. Ztschr.*, 1926, 171, p. 45.
526. ZIEGLER (N. R.) et HALVORSON (H O.). — Applications of statistics to problems in bacteriology. IV. Experimental comparison of the dilution method, the plate count, and the direct count for the determination of bacterial populations. *Journ. of Bacterio.*, 1935, 29, p. 610.
527. ZIKES. — *Allg. Ztschr. f. Bierbr.*, 1913, 41, p. 71 et p. 84.
528. ZLATAROFF (A.) et KALTSCHewa (D.). — Der Einfluss einiger Metallsalze auf die Milchsäuregärung. *Biochem. Ztschr.*, 1936 284, p. 12.
-



TABLE DES MATIÈRES

Introduction.	15
-----------------------	----

PREMIÈRE PARTIE

CHAPITRE PREMIER.

Techniques utilisées d'une façon générale pour l'étude quantitative de la multiplication microbienne.

I. — Méthodes donnant le nombre total des microbes (« morts » et « vivants ») présents dans la culture.	25
a) Méthodes permettant d'évaluer la masse microbienne :	
1 ^o Mesure du volume des masses microbiennes.	25
2 ^o Mesure du poids des masses microbiennes.	26
3 ^o Évaluation du trouble apporté aux milieux liquides par la masse microbienne	27
4 ^o Évaluation de la quantité de colorant absorbée par la masse microbienne.	29
Critique de ces différentes méthodes	30
b) Méthodes microscopiques permettant la numération des éléments microbiens :	
1 ^o Évaluation du nombre de microbes par numération microscopique directe.	32
2 ^o Évaluation du nombre des microbes au moyen d'une cellule compte-microbes.	34
3 ^o Évaluation du nombre des microbes par numération microscopique comparative	37
II. — Méthodes donnant le nombre des microbes capables de se reproduire après ensemencement sur un milieu nutritif différent de leur milieu originel (microbes appelés « vivants » par les auteurs)	39
1 ^o Numération après dilution et ensemencement en milieu liquide	40
2 ^o Numération après dilution et ensemencement sur milieux solidifiés.	41

III. — Détermination du nombre des microbes « vivants » par examen microscopique	47
1 ^o Évaluation du nombre des microbes « vivants » par examen morphologique	47
2 ^o Évaluation du nombre des microbes « vivants » par numération microscopique après coloration élective.	48
IV. — Méthodes basées sur l'activité biochimique des bactéries	49

CHAPITRE DEUXIÈME.

Méthodes de numération des microbes utilisées dans nos essais.

I. — Technique de la numération microscopique compara- tive (selon la méthode de WRIGHT-FRIES) de la totalité des éléments microbiens.	51
II. — Technique de la numération microscopique directe à l'aide de cellules « compte-microbes »	55
A) Description des cellules compte-microbes expéri- mentées.	55
B) Technique utilisée dans l'emploi de ces cellules compte-microbes.	58
C) Expériences personnelles.	59
1 ^o Comparaison de la technique microscopique du « compte-microbes » avec la méthode microscopique comparative de WRIGHT-FRIES. Choix du colorant.	
a) Appréciation des résultats	61
b) Exposé de nos résultats	61
2 ^o Discussion de nos résultats et conclusions.	68
III. — Technique de numération des microbes capables de se reproduire après ensemencement en bouillon gélosé.	72

CHAPITRE TROISIÈME.

Vue d'ensemble de la poussée microbienne.

I. — Travaux fondamentaux relatifs à l'étude numérique de la multiplication microbienne	75
II. — Étude particulière des différentes phases de la multiplication microbienne.	78
A) <i>Phase de latence :</i>	
1 ^o Principaux facteurs qui exercent une influence sur la durée de la phase de latence.	81
2 ^o Hypothèses émises par les différents auteurs pour expliquer l'existence de la phase de latence . . .	84
B) <i>Phase de multiplication logarithmique :</i>	
Examen des facteurs qui exercent une influence sur la phase logarithmique	88
C) <i>Phase de multiplication ralentie</i>	91
D) <i>Phase de maximum stationnaire</i>	91
E) <i>Phase de destruction des bactéries.</i>	92
F) <i>Hypothèses émises par différents auteurs pour expliquer le ralentissement, puis l'arrêt de la multiplication microbienne</i>	92
III. — Comparaison, au cours de la multiplication microbienne, du nombre des microbes « visibles » au nombre des microbes « vivants »	97

CHAPITRE QUATRIÈME.

Constitution du milieu de culture utilisé dans nos essais. Choix de la peptone.

I. — Définition, préparation, composition et valeur bactériologique des différentes peptones	100
II. — Peptone utilisée dans nos essais :	
a) Propriétés	103

b) Dialyse de cette peptone.	104
c) Caractères de la solution de peptone dialysée pendant quarante-huit heures	106
d) Caractères de la solution de peptone dialysée pendant quinze jours.	106
1° Quantité de chlorures contenue dans les solutions de peptones expérimentées	106
2° Quantité totale de sels contenue dans les solutions de peptones expérimentées	108
e) Valeur bactériologique de la peptone pepsique non dialysée et de la peptone pepsique dialysée pendant quarante-huit heures	109
f) Valeur bactériologique de la solution de peptone pepsique ayant subi une dialyse de quinze jours, et utilisée dans nos essais	112

DEUXIÈME PARTIE

Étude de l'influence qu'exercent quelques cations sur la multiplication du bacille pyocyanique.

CHAPITRE PREMIER.

I. — Premières observations et premiers travaux fondamentaux	116
II. — Autres travaux	128
a) Champignons.	128
b) Microbes.	135
c) Applications réalisées sur les végétaux supérieurs . .	147
III. — Loi d'Arndt-Schulz	149
IV. — Action toxique due à de très faibles doses de certaines substances :	
a) Mise en évidence de cette action.	154
b) Essais d'utilisation pratique de l'action toxique exercée par de très faibles quantités de certains métaux.	160

<i>c)</i> Essais d'explication de l'action toxique de très faibles doses de métaux ou de sels métalliques (interprétation de H. DEVAUX, GENEVOIS, GENAUD).	161
<i>d)</i> Particularités de l'ion argent	165
V. — Hypothèses émises par différents auteurs pour expliquer les actions favorisantes	165

CHAPITRE DEUXIÈME.

I. — Expériences personnelles	175
1 ^o Choix du microbe	175
2 ^o Matériel employé	176
3 ^o Milieux employés	176
4 ^o Choix des cations	178
5 ^o Choix de l'anion.	178
6 ^o Mode opératoire utilisé.	179
7 ^o Marche suivie pour une expérience.	180
II. — Étude détaillée d'une multiplication microbienne normale.	181
III. — Exposé des résultats obtenus (tableaux et graphiques) :	
<i>a)</i> Action du nitrate de lanthane.	189
<i>b)</i> Action du nitrate de cérium	211
<i>c)</i> Action du nitrate de plomb.	233
<i>d)</i> Action du nitrate mercurique	257
<i>e)</i> Action du nitrate d'argent	281
IV. — Discussion des résultats obtenus :	
1 ^o <i>Comparaison des résultats obtenus avec les cultures-témoins.</i>	305
2 ^o <i>Comparaison des résultats concernant l'influence de certains sels métalliques sur la multiplication du bacille pyocyanique.</i>	308

A) Nitrate de lanthane :

- 1^o Influence du nitrate de lanthane à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique. 308
 - a) Existence de doses excitantes, indifférentes et toxiques 308
 - b) Allure de la courbe de croissance 309
- 2^o Influence du nitrate de lanthane à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique. 310
 - a) Rapport de vitalité 310
 - b) Conservation. 311
- 3^o Influence du nitrate de lanthane à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique 312
 - a) Morphologie 312
 - b) Pigmentation. 313

B) Nitrate de cérium :

- 1^o Influence du nitrate de cérium à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique. 314
 - a) Existence de doses excitantes, indifférentes et toxiques 314
 - b) Allure de la courbe de croissance 315
- 2^o Influence du nitrate de cérium à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique. 316
 - a) Rapport de vitalité 316
 - b) Conservation. 317
- 3^o Influence du nitrate de cérium à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique. 318
 - a) Morphologie 318
 - b) Pigmentation. 318

C) Nitrate de plomb :

- 1° Influence du nitrate de plomb à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique 319
 - a) Existence de doses excitantes, indifférentes et toxiques 319
 - b) Allure de la courbe de croissance 320
- 2° Influence du nitrate de plomb à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique. 321
 - a) Rapport de vitalité 321
 - b) Conservation. 322
- 3° Influence du nitrate de plomb à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique. 323
 - a) Morphologie 323
 - b) Pigmentation. 323

D) Nitrate mercurique :

- 1° Influence du nitrate mercurique à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique. 324
 - a) Existence de doses excitantes, indifférentes et toxiques 324
 - b) Allure de la courbe de croissance 326
- 2° Influence du nitrate mercurique à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique. 327
 - a) Rapport de vitalité 327
 - b) Conservation. 327
- 3° Influence du nitrate mercurique à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique 328
 - a) Morphologie 328
 - b) Pigmentation. 329

E) Nitrate d'argent.	
1° Influence du nitrate d'argent à diverses concentrations sur la multiplication du bacille pyocyanique	329
a) Existence de doses indifférentes et toxiques .	329
b) Allure de la courbe de croissance	331
2° Influence du nitrate d'argent à diverses concentrations sur le rapport de vitalité et la conservation du bacille pyocyanique	332
a) Rapport de vitalité	332
b) Conservation.	334
3° Influence du nitrate d'argent à diverses concentrations sur la morphologie et la pigmentation du bacille pyocyanique.	335
a) Morphologie	335
b) Pigmentation.	335
V. — Conclusions de la deuxième partie	336

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER.

Généralités sur la charge électrique.

I. — Notion de charge électrique en général. Électrisation de contact des substances inertes. Règles d'électrisation.	342
II. — Charge électrique des bactéries. Existence de la charge	344
III. — Influence de certains facteurs sur l'électrisation des microbes :	
1° Influence de la concentration en électrolytes de la suspension bactérienne	349

2° Influence de l'âge de la culture	351
3° Influence de la concentration en germes	351
IV. — Relations entre l'électrisation des microbes et certaines de leurs propriétés :	
1° Relation entre l'électrisation des microbes et l'espèce de ceux-ci.	353
2° Relation entre la valeur de la charge électrique des microbes et leur virulence.	355
3° Relation entre la réaction de Gram et la charge électrique.	356

CHAPITRE DEUXIÈME.

Mesure de la charge des microbes. Description des appareils utilisés.

I. — Méthodes d'électrophorèse	359
A) Méthodes macroscopiques	360
a) Appareil employé par Ph. Lasseur.	361
b) Appareil employé par M ^{lle} Choucroun	361
B) Méthodes microscopiques :	
1° Appareil employé par Ph. Lasseur.	364
2° Appareil employé par Falk et ses élèves	365
Inconvénients de ces appareils.	366
3° Appareil utilisé par M ^{lle} Choucroun.	367
a) Description de l'appareil.	367
b) Technique à suivre pour l'emploi de cette cuve .	368
Nettoyage.	368
Fixation de la lamelle couvre-objet.	368
Remplissage de la cuve.	369
Examen de la cuve.	369
Mise au point	369
Détermination de la charge	371

CHAPITRE TROISIÈME.

Expériences personnelles.

I. — Les charges électriques des microbes varient-elles au cours de la multiplication microbienne normale comme varie la courbe qui traduit cette multiplication?	373
Résultats	375
II. — L'action excitante ou inhibitrice du nitrate de lanthane est-elle en relation avec une variation de l'électrisation.	378
Explication d'une expérience et résultats	379
III. — Conclusions de la troisième partie.	382
Résumé et conclusions	383
Bibliographie	387
Table des matières.	421

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

**CONSTITUTION CELLULAIRE
ET PERMÉABILITÉ DE LA CELLULE
VÉGÉTALE**

Vu et approuvé :

Paris, le 26 Avril 1937.

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

Ch. MAURAIN

Vu

et Permis d'imprimer

**Le Recteur de l'Académie
de Paris,**

S. CHARLÉTY



IMPRIMERIE DE VAUGIRARD
L.-M. Fortin, directeur
152, rue de Vaugirard, Paris 1937



